



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

**Introgresión de genes de resistencia al virus
TYLCV en dos variedades tradicionales de
tomate: estudio de la eficacia y del efecto de
la resistencia sobre las nuevas líneas de
mejora**

José Ángel Cabrera Miras

Director de la tesis

Dr. D. Juan José Ruiz Martínez

Codirector de la tesis

Dr. D. Santiago García Martínez



La presente Tesis Doctoral, titulada “Introgresión de genes de resistencia al virus TYLCV en dos variedades tradicionales de tomate: estudio de la eficacia y del efecto de la resistencia sobre las nuevas líneas de mejora”, se presenta bajo la modalidad de **tesis por compendio** de las siguientes **publicaciones**:

- Cabrera, J.Á.; Carbonell, P.; Salinas, J.F.; Grau, A.; Alonso, A.; Hernández, F.; Ruiz, J.J.; García-Martínez, S. Effect of Introgression of *Ty-1* and *ty-5* Genes on Productivity, Quality and Antioxidant Compounds in De la pera Tomato Breeding Lines. *Agriculture* **2024**, *14*, 1192. <https://doi.org/10.3390/agriculture14071192>
- Cabrera, J.Á.; Carbonell, P.; Alonso, A.; Pérez-Moro, C.; Pérez de Castro, A.; Ruiz, J.J.; García-Martínez, S. Assessment of resistance of *Ty-1* and *ty-5* genes in *Solanum lycopersicum* plants infected with tomato yellow leaf curl virus (TYLCV). *Scientia Horticulturae* **2025**, *342*, 114012. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2025.114012>



El Dr. D. *Juan José Ruiz Martínez*, director, y el Dr. D. *Santiago García Martínez*, codirector de la tesis doctoral titulada **“Introgresión de genes de resistencia al virus TYLCV en dos variedades tradicionales de tomate: estudio de la eficacia y del efecto de la resistencia sobre las nuevas líneas de mejora”**

INFORMAN:

Que D. *José Ángel Cabrera Miras* ha realizado bajo nuestra supervisión el trabajo titulado **“Introgresión de genes de resistencia al virus TYLCV en dos variedades tradicionales de tomate: estudio de la eficacia y del efecto de la resistencia sobre las nuevas líneas de mejora”** conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmamos para los efectos oportunos, en Orihuela a 11 de julio de 2025

Director de la tesis

Dr. D. *Juan José Ruiz Martínez*

Codirector de la tesis

Dr. D. *Santiago García Martínez*



La Dra. Dña. *Juana Fernández López*, Coordinadora del Programa de Doctorado en **Recursos y Tecnologías Agrarias, Agroambientales y Alimentarias**

INFORMA:

Que D. *José Ángel Cabrera Miras* ha realizado bajo la supervisión de nuestro Programa de Doctorado el trabajo titulado **“Introgresión de genes de resistencia al virus TYLCV en dos variedades tradicionales de tomate: estudio de la eficacia y del efecto de la resistencia sobre las nuevas líneas de mejora”** conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmo para los efectos oportunos, en Orihuela a 11 de julio de 2025

Profa. Dra. Dña. *Juana Fernández López*

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



A mis directores;

Juan José Ruiz Martínez,

por tu orientación y dirección, gracias por estar a mi lado.

A Santiago García Martínez,

por tu dirección académica,

por todo lo que me has enseñado,

por tu paciencia infinita ...

Sin ti no hubiera sido lo mismo, gracias.



*A mis compañeros y compañeras;
al área de genética de la EPSO y
a todas las personas que se sienten cerca de mi,
gracias por vuestro apoyo.*

*“A mi gente”;
gracias por todos los momentos que seguimos teniendo,
cómo nos reímos.*

*A toda mi familia, gracias.
Alejandro, sobrino, también formas parte de esta aventura.
Paqui, hermana, gracias por estar siempre.*

*Mi agradecimiento más personal es para mis padres, Ángel y Juana,
sin vuestro apoyo incondicional todo esto no hubiere pasado...*

Os quiero, siempre os recordaré.



La tesis doctoral se pudo desarrollar gracias al contrato FPU18/01399 del “Programa estatal de promoción del talento y su empleabilidad, subprograma de Formación de Profesorado Universitario (FPU)”, del Ministerio de Universidades del Gobierno de España, obtenida bajo el proceso selectivo de concurrencia competitiva a nivel nacional.



Índice

Resumen	11
Abstract.....	14
1. Introducción.....	18
1.1. Distribución del tomate y su influencia social: del nuevo al viejo mundo	24
1.2. Reconstrucción de la historia de la domesticación: del tomate silvestre al tomate cultivado.....	27
1.2.1. El tomate cultivado (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) y sus especies silvestres relacionadas.....	27
1.2.2. Trayectoria evolutiva de los rasgos de la domesticación y la mejora	34
1.3. Variedades tradicionales e híbridas: problemas y soluciones frente a la pérdida de diversidad	42
1.4. Mejora y cambio climático	48
1.5. Virus del rizado amarillo del tomate, TYLCV.....	51
1.6. Loci de resistencia a TYLCV	56
1.6.1. Efecto de la introgresión de la resistencia genética a virus	59
1.6.2. Alternativas para reducir el efecto negativo de la introgresión del gen <i>Ty-1</i> en homocigosis	60
2. Objetivos.....	63
3. Materiales y métodos.....	65
3.1. Metodología	65
3.1.1. Objetivo 1: complementar la resistencia genética a TYLCV a partir de líneas con el gen <i>Ty-1</i> y continuar con el desarrollo de las mismas con el gen <i>ty-5</i>	65
3.1.2. Objetivo 2: obtención de nuevas líneas no recombinantes con las diferentes combinaciones de genotipos en homocigosis para los dos genes	65
3.1.2.1. Obtención de nuevas líneas recombinantes con las diferentes combinaciones de genotipos en homocigosis para los dos genes	66
3.1.2.2. Diseño de marcadores moleculares ligados al gen <i>Ty-1</i> para la búsqueda de individuos recombinantes que hayan perdido parte de la carga de ligamiento asociada al gen <i>Ty-1</i>	67
3.1.3. Objetivo 3: estudio del efecto de la introgresión de los genes <i>Ty-1</i> y <i>ty-5</i> en caracteres productivos, de calidad y capacidad antioxidante de los frutos de tomate.....	70

3.1.4. Objetivo 4: evaluación de la resistencia de los genes <i>Ty-1</i> y <i>ty-5</i> en plantas infectadas con TYLCV	70
3.1.5. Marcadores y protocolos de actuación HRM	72
3.2. Material vegetal	75
4. Discusión	81
5. Conclusiones	86
6. Referencias	88
<i>PUBLICACIONES</i>	109



Resumen

Se ha trabajado con dos variedades tradicionales de tomate, Muchamiel y De la pera, con el objetivo de incrementar su resiliencia frente a uno de los principales virus que afecta a este cultivo tan importante, tanto a nivel mundial como nacional. Como en cualquier otro cultivo, la aparición de plagas y enfermedades obliga a realizar ciertas labores para combatirlas y evitar la pérdida y/o merma de la cosecha. Los virus son microorganismos que necesitan de otro ser vivo para poder desarrollarse. Estas enfermedades virales suelen combatirse controlando la forma que utiliza el virus para transmitirse, o bien introduciendo genes de resistencia a dichas enfermedades. Los virus que afectan a vegetales pueden transmitirse de diferente forma: vegetativamente, mecánicamente, a través de la semilla y el polen, y principalmente a través de agentes vectores como insectos, nematodos, ácaros y hongos. Por otro lado, de forma generalizada se podría decir que un gen de resistencia es una secuencia específica en el código genético de la planta cuya labor es, cuando se produce la detección del virus en el organismo, activar un mecanismo de defensa e impedir o retardar la reproducción del virus. Es decir, evita que el virus se multiplique utilizando las células de la planta sana. Sin este mecanismo de defensa, el virus alteraría su metabolismo de forma gradual induciendo el desarrollo de síntomas y un deterioro de la planta que impide un crecimiento adecuado. Los síntomas pueden variar desde simples cambios de color hasta necrosis severa o muerte súbita de la planta.

La enfermedad en la que se basa la presente investigación es el virus del rizado amarillo del tomate, cuyo nombre y nomenclatura se ha definido como Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV). Es un virus que desde su aparición en 1939 sigue afectando gravemente a los cultivos de tomate de todo el mundo, en parte debido a su facilidad para recombinar y aparición de nuevas mutaciones. El virus es transmitido por la mosca blanca (*Bemisia tabaci*), y puesto que las medidas dirigidas a controlar las poblaciones de *B. tabaci* no resultan del todo efectivas y siempre hay riesgo de infección, el mejor mecanismo de defensa es la resistencia genética. Hasta el momento se han descrito 6 genes para TYLCV, *Ty-1*, *Ty-2*, *Ty-3*, *Ty-4*, *ty-5* y *Ty-6*, pero todos condicionan niveles variables de tolerancia, ninguno ofrece resistencia completa. Esto quiere decir que aunque se dispongan de materiales con alguno de estos genes, el virus puede desarrollarse en diferentes grados, dependiendo del fondo genético de la planta, de la cepa del virus o de los factores ambientales. Dicho lo anterior, la mejor estrategia es la acumulación de varios de estos genes para obtener niveles más altos de

resistencia y que el virus encuentre más barreras para infectar la planta. La estrategia que se siguió en este estudio fue complementar la resistencia a TYLCV mediante la introgresión de genes de resistencia asistida por marcadores moleculares y obtener semillas con *Ty-1* y *ty-5*, para posteriormente con todas las combinaciones de estos dos genes (plantas con los dos genes, plantas con cada uno de los genes y plantas sin ninguno de estos genes), evaluar su comportamiento, tanto a nivel de caracteres productivos y de calidad como a nivel de acumulación de carga viral.

De forma general, en los párrafos anteriores se ha introducido y justificado brevemente el origen de este estudio, pero el contenido principal del texto además va acompañado de un trasfondo el cual también hay que tener en cuenta. Es indudable que el cambio climático está teniendo un gran impacto en la actividad agrícola y en la productividad de los ecosistemas agrarios. Algunas investigaciones demuestran que el cambio climático disminuye la capacidad de las plantas para resistir a los impactos climáticos. Factores como el incremento de temperatura y la sequía hace que los cultivos sean más vulnerables a las plagas en general, por lo que algunos científicos creen que aunque la tendencia sea hacia la reducción de tratamientos con plaguicidas, se incrementará el uso de pesticidas, dando lugar a un círculo vicioso y afectando negativamente al medio ambiente y a la salud pública. Retomando la mejora de plantas, si nos “olvidamos” de controlar los insectos vectores de enfermedades a través de la aplicación de tratamientos para su control, mediante la introducción de genes de resistencia, estaríamos contribuyendo a disminuir el uso de pesticidas. Por otro lado, para aumentar la base genética disponible y recuperar las variedades locales desplazadas por las variedades comerciales, la mejora genética es la mejor estrategia como se ha mencionado anteriormente. También hay que tener en cuenta que a lo largo de los años los programas de mejora se han enfocado en introducir resistencias a plagas y enfermedades, incrementar la productividad y buen comportamiento postcosecha, lo que ha contribuido a la pérdida de esta diversidad en los campos de cultivo. En los últimos años los esfuerzos además se están concentrando en la mejora del sabor del tomate y la calidad nutricional. Desde hace ya unos años, algunos consumidores han cambiado sus hábitos de consumo inclinándose por el sabor y el gusto. Es decir, lo que se busca son “tomates con sabor a tomate”, y esto lo encontramos en las variedades tradicionales. Debido a esta demanda, obtener variedades tradicionales con resistencias a los virus más importantes que afectan al cultivo de tomate, es una estrategia que hace posible poder cultivar y ofrecer al

mercado estas variedades con buen sabor y calidad nutricional sin que se pierda esta diversidad o se almacene en cámaras de conservación. La gran riqueza en compuestos bioactivos beneficiosos para la salud ofrece un valor añadido que puede explotar el sector agroalimentario, diferenciándose de los sistemas de cultivo convencionales.

A modo de resumen se enumeran de forma general las fases que se desarrollaron para poder llevar a cabo este trabajo y cumplir el objetivo de la tesis doctoral. Partiendo de líneas de mejora con el *Ty-1* ya introducido: se realizaron los retrocruzamientos correspondientes al otro gen, el *ty-5*; se obtuvieron las semillas con las características deseadas en suficientes cantidades para poder realizar los ensayos, tanto de campo como en condiciones controladas; a continuación, se procedió a la toma de datos, análisis e interpretación de los resultados para finalmente ser publicados en dos artículos en revistas científicas de alto impacto. La tesis doctoral se presenta por compendio de artículos: "Effect of Introgression of *Ty-1* and *ty-5* Genes on Productivity, Quality and Antioxidant Compounds in De la Pera Tomato Breeding Lines" y "Assessment of resistance of *Ty-1* and *ty-5* genes in *Solanum lycopersicum* plants infected with Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)".

Miguel
Hernández

Abstract

Two traditional tomato varieties have been studied: Muchamiel and De la pera, with the aim of increasing resilience against one of the main virus affecting this important crop, both at a global and national level. As in any other crop, the appearance of pests and diseases makes it necessary to carry out certain tasks to combat them and avoid the loss and/or reduction of the harvest. Viruses are micro-organisms that need another living being in order to develop. These viral diseases are usually combated by controlling the way in which the virus transmits itself, or by introducing resistance genes to these diseases. Viruses affecting plants can be transmitted in different ways: vegetatively, mechanically, through seed and pollen, and mainly through vectors such as insects, nematodes, mites and fungi. On the other hand, in general terms, a resistance gene is a specific sequence in the genetic code of the plant whose task, when the virus is detected in the organism, is to activate a defence mechanism and prevent or delay the reproduction of the virus. In other words, it prevents the virus from multiplying using the cells of the healthy plant. Without this defence mechanism, the virus would gradually alter its metabolism inducing the development of symptoms and a deterioration of the plant that prevents proper growth. Symptoms can range from simple colour changes to severe necrosis or sudden death of the plant.

The disease on which this research is based is Tomato yellow leaf curl virus, whose name and nomenclature has been defined as Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV). It is a virus that, since its emergence in 1939, continues to severely affect tomato crops worldwide, partly due to its ease of recombination and the emergence of new mutations. The virus is transmitted by the whitefly (*Bemisia tabaci*), and since measures to control *B. tabaci* populations are not entirely effective and there is always a risk of infection, the best defence mechanism is genetic resistance. So far, 6 genes have been described for TYLCV, *Ty-1*, *Ty-2*, *Ty-3*, *Ty-4*, *ty-5* and *Ty-6*, but all of them condition variable levels of tolerance, none of them offers complete resistance. This means that, even if materials with some of these genes are available, the virus can develop to different degrees, depending on the genetic background of the plant, the virus strain or environmental factors. That said, the best strategy is the accumulation of several of these genes to obtain higher levels of resistance and for the virus to encounter more barriers to infect the plant. The strategy followed in this study was to complement resistance to TYLCV through the introgression of resistance genes assisted by molecular markers, and to obtain

seeds with *Ty-1* and *ty-5*, and subsequently with all combinations of these two genes (plants with both genes, plants with each of the genes and plants without either of these genes), to evaluate their behaviour, both in terms of productive and quality traits and in terms of viral load accumulation.

In general terms, the previous paragraphs have briefly introduced and justified the origin of this study, but the main content of the text is also accompanied by a background which must also be taken into account. There is no doubt that climate change is having a major impact on agricultural activity and the productivity of agricultural ecosystems. Some research show that climate change reduces the ability of plants to withstand climatic shocks. Factors such as increased temperatures and drought make crops more vulnerable to pests in general, so some scientists believe that, even if the trend is towards reduced pesticide treatments, pesticide use will increase, leading to a vicious circle and negatively affecting the environment and public health. Returning to plant breeding, if we 'forget' about controlling insect vectors of diseases through the application of treatments for their control, by introducing resistance genes, we would be contributing to reducing the use of pesticides. On the other hand, to increase the available genetic base and to recover local varieties displaced by commercial varieties, breeding is the best strategy, as mentioned above. It should also be taken into account that over the years, breeding programmes have focused on introducing resistance to pests and diseases, increasing productivity and good post-harvest performance, which has contributed to the loss of this diversity in the fields. In recent years, efforts are also concentrating on improving the flavour and nutritional quality of tomatoes. For some years now, some consumers have been changing their consumption habits in favour of taste and flavour. In other words, what they are looking for are 'tomatoes with tomato flavour', and this can be found in the traditional varieties. Due to this demand, obtaining traditional varieties with resistance to the most important viruses that affect tomato cultivation is a strategy that makes it possible to cultivate and offer the market these varieties with good flavour and nutritional quality without losing this diversity or storing them in preservation chambers. The great richness in bioactive compounds beneficial to health offers an added value that can be exploited by the agri-food sector, differentiating it from conventional cultivation systems.

By way of summary, the phases that were developed in order to carry out this work and fulfil the objective of the doctoral thesis are listed in general terms.

Starting from breeding lines with *Ty-1* already introduced: the backcrosses corresponding to the other gene, *ty-5*, were carried out; seeds with the desired characteristics were obtained in sufficient quantities to be able to carry out the tests, both in the field and under controlled conditions; then, the data were collected, analysed and the results interpreted to be finally published in two articles in high-impact scientific journals. The doctoral thesis is presented as a compendium of articles: 'Effect of Introgression of *Ty-1* and *ty-5* Genes on Productivity, Quality and Antioxidant Compounds in De la Pera Tomato Breeding Lines' and 'Assessment of resistance of *Ty-1* and *ty-5* genes in *Solanum lycopersicum* plants infected with Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)'.



INTRODUCCIÓN



1. Introducción

Aunque no siempre ha sido así, el tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Figura 1) es uno de los ingredientes más utilizados en la cocina a nivel mundial. Al principio los europeos consideraban el tomate como una planta decorativa o una curiosidad botánica, incluso se pensaba que era venenosa por contener la tomatina (alcaloide que se encuentra presente en las hojas y en el fruto verde pero que se degrada con la maduración, entre otros) y por su relación con otros ejemplares de la familia de las solanáceas como el beleño¹ o la belladona² (Figura 1), familia que adoptó como táctica defensiva el desarrollo de una serie de complejos principios activos de elevada toxicidad (Rodríguez et al., 1984). A pesar de que los aztecas ya lo consumían en Mesoamérica antes de la llegada de los españoles a América (Esquinas-Alcázar y Nuez, 1995), no fue hasta principios del siglo XIX cuando se convirtió en un popular ingrediente de la cocina mediterránea, aunque en España e Italia se utilizó en la alimentación humana prácticamente desde su introducción (Quer, 1762-84). Los tomates crecían fácilmente en el clima mediterráneo de España e Italia. En Sevilla, al menos en 1608, ya se utilizaban con fines culinarios, probablemente en ensalada junto con los pepinos. Como señala el historiador culinario Rudolf Grewe, el primer libro de cocina conocido con recetas de tomate (Figura 2) se publicó en Nápoles en 1692, titulado “Lo scalco alla moderna” y escrito por Antonio Latini³. Sin embargo, el autor identificó las recetas como de origen español (Smith, 1994). Por otro lado, no fue hasta la mitad del siglo XVIII cuando en 1747, aparece la primera receta de salsa de tomate de la monarquía española

¹ Beleño negro: *Hyoscyamus niger* L. (véase también *Hyoscyamus albus* L.). Perteneciente a la familia *Solanaceae*, posee alcaloides tropánicos como la escopolamina, la hiosciamina y la tropina. Toda la planta contiene fitotoxinas pero las partes más tóxicas son las hojas, los frutos y las semillas. Plantas tóxicas. Informes, estudios e investigación 2022. Ministerio de Sanidad. Gobierno de España. NIPO en línea: 133-22-020-8.

² Belladona: *Atropa belladonna* L. Perteneciente a la familia *Solanaceae*, posee hiosciamina y atropina como fitotoxinas, aunque pueden encontrarse en menor cantidad otros alcaloides como apotropina y escopolamina. Toda la planta contiene fitotoxinas pero las partes más tóxicas son las hojas y sobre todo el fruto. Plantas tóxicas. Informes, estudios e investigación 2022. Ministerio de Sanidad. Gobierno de España. NIPO en línea: 133-22-020-8.

³ Antonio Latini: trabajó como superintendente de cocinas, seleccionando y dirigiendo a los cocineros y a los sirvientes, abasteciendo la despensa y organizando banquetes. En los últimos años de su vida recopiló *Lo scalco alla moderna*, donde entre otras muchas recetas, hace referencia a la primera receta impresa de salsa de tomate. *La prima volta di un sugo al pomodoro*. Biblioteca e Museo della Cucina. <https://www.museodellacucina.com/la-prima-volta-di-un-sugo-al-pomodoro/>.

escrita por Juan de la Mata⁴ en su recetario “Arte de repostería” (Figura 2) (López-Terrada, 2022).

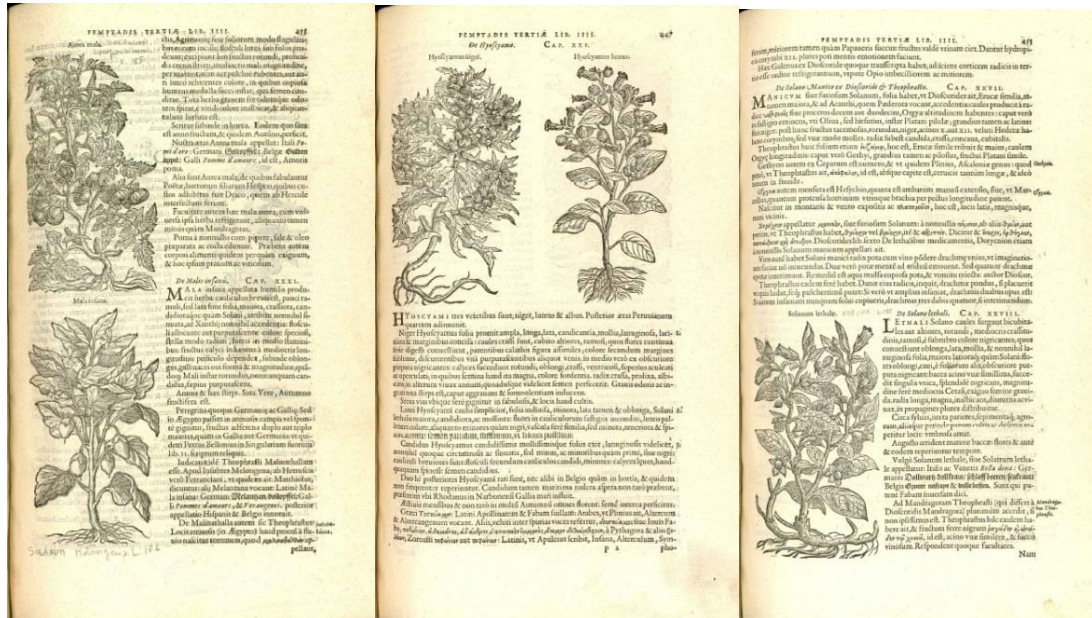


Figura 1. Izquierda superior, Aurea mala (*Solanum lycopersicum* L., tomate). Centro izquierda, Hyofcyamus niger (*Hyoscyamus niger* L., beleño). Derecha, *Solanum lethale* (*Atropa belladonna* L., belladonna). Rembert Dodoens, en su tratado botánico *Stirpium historiae pemptades sex. Sive libri XXX*, 1583 (considerada la obra recopilatoria de todos sus trabajos).

⁴ Juan de la Mata: natural de Matalavilla (Palacios del Sil, León) muy posiblemente llegó a España como parte de esa inmigración que regresó de Italia con la llegada de Felipe V y la Guerra de Sucesión, puesto que afirma que había trabajado para el duque de Atri. Dos años después de aparecer el *Nuevo arte de cocinas* de Juan Altamira en 1745 (menciona al tomate pero como ingrediente), Mata ya era repostero en Madrid y publicó su *Arte de repostería*, destinado a un público más refinado y experto que el del libro del fraile. Biografía de Juan de la Mata. Real Academia de la Historia. Ministerio de Ciencia, Historia y Universidades. Gobierno de España. <https://historia-hispanica.rah.es/biografias/29257-juan-de-la-mata>.

444 *Lo Scalco alla Moderna*
Salsa di Pomodoro, alla Spagnola.
 Piglierai una mezza dozzena di Pomodoro, cho
 sieno mature; le porrai sopra le brage, à brustolarle, e
 dopò che saranno abbrucate, gli leverai la scorza dili-
 gentemente, e le triterai minutamente con il Coltello,
 e v'aggiungerai Cipolle tritate minute, à discrezione;
 Preparo puse tritato minuto, Sepollo, ò Piperaja in
 poca quantità, a mescolando ogni cosa insieme, l'ac-
 commoderai con un pò di Sale, Ooglio, & Aceto, che
 farà una Salsa molto gustosa, per bollito, ò per alcro.
Sapore di Ribes, detto in Napoli, Salsa de'
Cardinali
 Si doglie il Ribes; quando è ben maturo, che sieno
 li Granelli quasi negri, perche essendo essi di color
 rosso, pajono sempre maturi, e dopò che gli havrai
 ben lavati, e pobbi in Acqua, gli porrai à scolare den-
 tro un Crivello, ò altro, e quando saranno ben scicut-
 ti, havendo prima preparato il Zucchero, che sia ben
 purgato, e quasi arriato alla cottura; vi porrai den-
 tro li sudetti Granelli, e li farai bollire per poco spa-
 tio di tempo, essendo di natura facili à disfarsi, gli vol-
 terai sempre con una Spatola di legno; & arrivati à
 perfezione, gli leverai, passerai per Stamigna, ò Sa-
 taccio; questo è un Sapore, che si conserva lungo te m-
 p o e benchè in queste parti non si usi, perche non vo-
 ne stà; nondimeno in Roma, & in altre parti si prati-
 ca, & è molto stimato da gran Signori; si serve in
 Tordinona n Zucchero fino, e Cannella sopra, e non si
 argo-

de Reposteria. Cap. XXXVI. 165
 CAPITULO XXXVI
 DE DIFERENTES GENEROS DE SALSAS,
 y modo de conservar el Ajo, y agrio de Limon.
 SALSA DE TOMATES A LA ESPAÑOLA.
 1 Despues de asados tres ó quatro Tomates, y lim-
 pios de su pellegito, se picarán encima de una
 mesa lo mas menudo que ser pueda, puestas en su sa-
 lera, se les añadirá un poco de Perejil, Cebolla y Ajo, asi-
 mismo picado con un poco de Sal, Pimienta, Azeyte
 y Vinagre, que todo bien mezclado è incorporado, se
 podrá servir.
 OTRA MANERA.
 2 Asados, limpios y picados los Tomates, del modo
 dicho, se mezclarán con un poco de Ajo, Cominos, Orega-
 no, Sal y Pimienta, asimismo molido, y se desleirá todo
 con un poco de caldo de la olla, y quatro gotas de Vina-
 gre, con lo que se servirá caliente.
 Executanse diferentes modos de estas Salsas, segun el
 gusto de cada uno, que por muy comunes se omiten.
 SALSA DE MOSTO TINTO.
 3 Echaranse en un Perol pequeño dos libras de Uva tin-
 ta desgranada, con medio Mambriño, dividido en peque-
 ñas partes, mondado, y sin corazon, y dos Camusas, lim-
 pias asimismo de su cascara y corazon; puesto el Perol
 al fuego, se meneará con una cuchara el compuesto hasta
 que esté bien deshecho y convertido en Mosto bien es-
 peso; en este punto, se pasará por un Colazo, por medio
 de una cuchara, oprimiendolo bien, de modo que solo
 reste la granilla sobre un plato ó cazuela, á lo que se
 añadirá un poco de Mostaza picante, ya hecha, segun se
 gustare, y un poco de especia fina, con lo que se podrá ser-
 vir fría.
 Esta Salsa es de las mas estimadas por su delicioso gus-
 to, á la que algunos suelen añadir un poco de dulce.
 SAL-

Figura 2. Izquierda, receta de salsa de tomate, a la española. Antonio Latini en su recetario *Lo scalco alla moderna*, 1692. Derecha, receta de salsa de tomates a la española. Juan de la Mata en su recetario *Arte de repostería*, 1747.

El tomate también estaba presente claramente en las ilustraciones cotidianas representadas por los pintores de la época, lo que refleja lo integrado que estaba este producto en la sociedad. Es tal su importancia, como otras frutas y verduras, o el pescado, que ha seguido representándose con diferentes técnicas de pintura hasta la actualidad. En las siguientes imágenes (Figuras 3-6) se puede ver algunas de las interpretaciones de ilustres pintores de diferentes épocas. No se disponen de restos arqueológicos antiguos del tomate. En las excavaciones del Valle de Tehuacán se han encontrado coprolitos con vestigios de la utilización de *Physalis* como alimento, en el periodo 900 a.C. – 1540 d.C. (Esquinas-Alcázar y Nuez, 1995).



Figura 3. Joris Hoefnagel, Lily and tomato, 1591-1596. Museo Getty, Los Ángeles.
https://www.didatticarte.it/Blog/?page_id=33101.



Figura 4. José López Enguñadanos, Bodegón con pescado, pimientos, tomate y limón, 1760-1812.
 Fondazione Federico Zeri. Università di Bologna.
<https://catalogo.fondazionezeri.unibo.it/home/it>.



Figura 5. Achille Beltrame, La raccolta del pomodoro, 1930. Collezione privata.
https://www.didatticarte.it/Blog/?page_id=33101



Figura 6. Pablo Picasso, Planta de tomate, 1944.
https://www.didatticarte.it/Blog/?page_id=33101

Aunque la actividad científica relacionada con la botánica no se definió claramente hasta el siglo XIX, los tratados botánicos del siglo XVI forman parte de un claro aumento del estudio de las plantas, en gran parte debido a las posibilidades de investigación que generaba el descubrimiento del Nuevo Mundo (López-Terrada, 2022). Aunque las especies vegetales se relacionaron en primera instancia con la materia médica, principalmente médicos y boticarios, es notable, que finalmente quedan relacionadas con la medicina, la botánica y la agricultura. La literatura del mundo vegetal ya está presente en las obras del filósofo griego Teofrasto⁵, y más tarde también en escritos de otros intelectuales de la época como Dioscórides⁶. A partir de estos textos clásicos, la mayor parte de los botánicos del siglo XVI adaptaron las nuevas especies vegetales llegadas

⁵ Tyrtamo, llamado Teofrasto: 374 a.C. – 289 a.C., discípulo y amigo de Aristóteles. Entre sus obras destacan la *Historia de las plantas* y las *Causas de las plantas*, en las que ofrece un detallado estudio de la flora conocida en su época, a través de una exhaustiva recopilación de plantas efectuada durante la campaña de Alejandro Magno, y en las que ofrece también un estudio sistemático de la vida vegetal, a la que investiga teniendo en cuenta la posibilidad de hallar unas *partes* comunes a todas ellas, pero combinadas a través de *diferencias*. Teofrasto. Herder Editorial. <https://encyclopaedia.herdereditorial.com/wiki/Autor:Teofrasto>.

⁶ Pedanio Dioscórides Anazarbeo: s. I d.C. Su obra la *Materia médica* ha marcado la historia de las plantas medicinales, siendo quizás, la más veces reeditada y traducida de la historia. Sigue siendo objeto de interés por numerosos estudiosos. Dioscórides. Universidad de Valencia. <https://www.uv.es/ihcd/Farmacologia/biodioscor.html>. Pudiéndole considerar el padre de la farmacología, esta obra fue traducida al árabe en el siglo X, en tiempos de Abderramán III; más tarde, la Escuela de Traductores de Toledo vertió al latín estos conocimientos, siendo la primera edición española en latín la de Antonio de Nebrija en 1518. En 1555 el editor Juan Latio publica en Amberes la traducción en castellano realizada por el doctor Andrés Laguna: médico del papa Julio III. De materia médica. Español. Biblioteca Nacional de España. <https://bdh.bne.es/bnearch/detalle/bdh0000037225>.

de otros territorios a las normas del sistema de clasificación existente, buscando similitudes y analogías (López Piñero y López Terrada, 1997). Algunos de los tratados más citados que revelan la evidencia del tomate en Europa son los escritos por los botánicos italianos Mattioli⁷ y Aldrovandi⁸, o por el neerlandés Dodoens⁹ (Figura 7), entre otros naturalistas europeos. Sin embargo, a pesar de la estrecha relación del tomate con España, es a principios del siglo XVII cuando el tomate es mencionado por Juan Eusebio Nieremberg¹⁰ en su *Historia naturae, maxime peregrinae libris XVI distincta* en 1635. Según María López Terrada, doctora en historia por la Universidad de Valencia e investigadora científica del CSIC en INGENIO (CSIC-UPV), la ausencia de textos españoles de historia natural del siglo XVI podría estar relacionada con los escritos redactados en y llegados de América (López-Terrada, 2022). Cabe decir, que la mayoría de los botánicos del Renacimiento no especificaron de donde provenían estas manzanas doradas o *pomi d'oro*. El debate sobre los primeros tomates europeos y su origen es una realidad, a menudo se ve obstaculizado por dataciones erróneas, identificaciones botánicas erróneas y fuentes históricas inaccesibles (van Andel et al., 2022). Se ha tratado de explicar de forma resumida, y para que se tenga una percepción concisa y global, los eventos de diferentes disciplinas más importantes de la historia del tomate. Además de los autores y autoras citados, van Andel et al. (2022) muestran con más detalle en una publicación bastante reciente titulada “Sixteenth-century tomatoes in Europe: who saw them, what they looked like, and where they came from”, descripciones, ejemplares e ilustraciones del tomate ordenadas por autor y cronológicamente.

⁷ Pietro Andrea Mattioli: 1501 – 1578. Realizo una revisión en profundidad del herbario médico de Dioscórides, actualizándolo a la luz de los conocimientos científicos de la época. Sapienza Università di Roma. <https://mostrevirtuali.uniroma1.it/mostra/conoscenzaemisericordia/>.

⁸ Ulisse Aldrovandi: 1522 – 1605. Creador de uno de los primeros museos de historia natural, consagrado como una de las figuras más importantes de la ciencia y un referente para los naturalistas italianos contemporáneos. Sapienza Università di Roma. <https://mostrevirtuali.uniroma1.it/mostra/conoscenzaemisericordia/>.

⁹ Rembert Dodoens: 1517 – 1585. Rembert Dodoens van Joenckema: 1517 – 1585. Recopiló todas sus obras en su tratado botánico *Stirpium historiae pemptades sex. Sive libri XXX* en 1583. Catálogo de la Biblioteca Nacional de Alemania. <https://d-nb.info/gnd/117646083>

¹⁰ Juan Eusebio Nieremberg: 1595 – 1658. Filósofo, teólogo y polígrafo nacido en Madrid, donde desarrolló sus estudios y se consideró una figura intelectual importante, dedicando sus esfuerzos al estudio de las artes y la teología en la Universidad. Real Academia de la Historia. Ministerio de Ciencia, Historia y Universidades. Gobierno de España. <https://dbe.rah.es/biografias/6972/juan-eusebio-nieremberg-y-ottin>.



Figura 7. Izquierda, primera mención del tomate en Europa por Pietro Andrea Mattioli en la primera edición de su *Medici Senensis Commentarii, in libros sex pedacii Dioscoridis Anazarbei, de Medica Materia*, 1544, líneas 11-14 (la imagen hace referencia a la versión de 1554). Centro, ejemplar de tomate más antiguo encontrado, conservado en el primer volumen del herbario de Ulisse Aldrovandi *Tom. Primus Plantar*, 1551 (el par de hojas al pie de la página pertenecen a un *Citrullus*). Derecha, primera ilustración xilográfica sin color publicada por Rembert Dodoens en su tratado *Stirpium historia Commentariorum imagines ad viuum expresse*, 1553.

1.1. Distribución del tomate y su influencia social: del nuevo al viejo mundo

El tomate es originario de la región andina, donde de forma espontánea existen numerosas especies silvestres (Jenkins, 1948; Esquinas-Alcázar y Nuez, 1995; Bai y Lindhout, 2007;), siendo una de las áreas considerada como uno de los centros de origen de acuerdo con Vavilov¹¹, el cual formuló una de las teorías sobre los centros de origen de plantas cultivadas más completas y famosas. Eso sí, teniendo en cuenta otras teorías propuestas por otros científicos con anterioridad, Darwin¹² y De Candolle¹³. El lugar donde se produjo la

¹¹ Nikolai Ivanovich Vavilov: en 1926, basándose en sus propias observaciones científicas y en el estudio de los materiales recolectados, Vavilov elaboró una teoría sobre el origen de las plantas cultivadas, según la cual la flora cultivada apareció y se desarrolló en relativamente pocos centros geográficos situados sobre todo en regiones montañosas. Las expediciones de Vavilov tenían como objetivo verificar esta teoría. Formulando su teoría, Vavilov habló de la «geografía de los genes», sentando así las bases de una nueva dirección científica. Zakharov, I.A. Nikolai I Vavilov (1887-1943). *J. Biosci.* **2005**, 30(3), 299-301. <https://doi.org/10.1007/BF02703666>

¹² Charles Robert Darwin: fue uno de los primeros científicos en elaborar una teoría sobre el parentesco de los organismos domesticados con los silvestres. Desarrolló sus ideas en “On the origin of species by means of natural selection or the preservation of favoured races in the struggle for life” (1859) y en “The Variation of animals and plants under domestication” (1868).

domesticación se le atribuye a México, entre otras evidencias, por estar muy integrado en la cultura azteca a diferencia de la región andina (Rick, 1978; Harvey et al., 2002; Saavedra et al., 2019), aunque está presente la teoría de que se pudo llevar a cabo en América del Sur. En 1948 Jenkins citó a varios autores que apoyaban ambas teorías. Los estudios recientes plantean que el tomate podría haber sufrido una primera domesticación en Sudamérica antes de la producida en Mesoamérica. En el punto 1.2.2 se recopila información con más detalle al respecto.

Después de la muerte de Magallanes en Filipinas (Mactán, 1521) en su intento por llegar a las Islas de las Especies (Islas Molucas), su piloto Juan Sebastián de Elcano consiguió finalizar la aventura llegando a Sanlúcar de Barrameda en septiembre de 1522 a bordo de la nao Victoria, completando la primera vuelta alrededor del mundo (Caramé, 2017). Después del comienzo de la colonización de Filipinas en 1565, España pudo controlar durante más de dos siglos sus territorios en el Pacífico, teniendo en cuenta las grandes posibilidades de comercio que tenían estas islas. El 8 de octubre de ese mismo año, con la llegada de Andrés Urdaneta a Acapulco, se establece un comercio transpacífico, inaugurando la línea comercial Manila-Acapulco-Veracruz-Sevilla (Figura 8), con un total de 25.000 millas náuticas y cruzando tres continentes y dos océanos, conectadas por una ruta terrestre que enlazaba Veracruz con Acapulco vía ciudad de México, conocida como camino de China (Caramé, 2017). Las naves llegaban a Sanlúcar y subían por el Guadalquivir hasta llegar a Sevilla,

Casas, A.; Torres, I.; Parra, F.; Torres, J. Centros de origen y diversificación de plantas cultivadas en América. En: *De los cultivos nativos y el cambio del clima. Hallazgos (Huánuco y Apurímac)*; Eds: Torres-Guevara, J.; Parra, F.; Casas, A.; Cruz, A. Proyecto PNIA 027-2015-INIA-PNIA/UPMSI/IE.

¹³ Alphonse Louis Pierre Pyramus de Candolle: posteriormente a Darwin, se enfrentó a la necesidad de explicar las “monstruosidades” de las plantas cultivadas que parecían tener rasgos afines a ejemplares silvestres y que desconcertaban a los botánicos por ser tan dispares en algunos caracteres. Reunió información de diferentes campos del conocimiento como la botánica (del que era especialista), la geografía, la etnografía o la historia, para proyectar las primeras ideas sobre las áreas del mundo donde pudo haberse originado la agricultura, siendo unas de las áreas propuestas Mesoamérica y la región andina como regiones de primordial importancia para algunos grupos de plantas. Desarrollo sus primeras ideas en “Origine des plantes cultivées” (1882). Casas, A.; Torres, I.; Parra, F.; Torres, J. Centros de origen y diversificación de plantas cultivadas en América. En: *De los cultivos nativos y el cambio del clima. Hallazgos (Huánuco y Apurímac)*; Eds: Torres-Guevara, J.; Parra, F.; Casas, A.; Cruz, A. Proyecto PNIA 027-2015-INIA-PNIA/UPMSI/IE.

aunque en 1717 el punto de partida y destino de las flotas se cambió de Sevilla a Cádiz, de más fácil acceso y evitando tanto la alta siniestralidad como el contrabando durante el tránsito por el Guadalquivir. Por lo que en España, probablemente, el tomate llegó en primer lugar a Sevilla, que era uno de los principales centros del comercio internacional, en particular con Italia (Caramé, 2017). De acuerdo con que el tomate se distribuyó por el viejo mundo desde España (también Portugal, aunque en menor medida), conectaba con Manila, resto de países de Europa y también con África y Oriente Medio. Desde Manila a otros países asiáticos, y a EE.UU llega vía México y Europa (Figura 8).

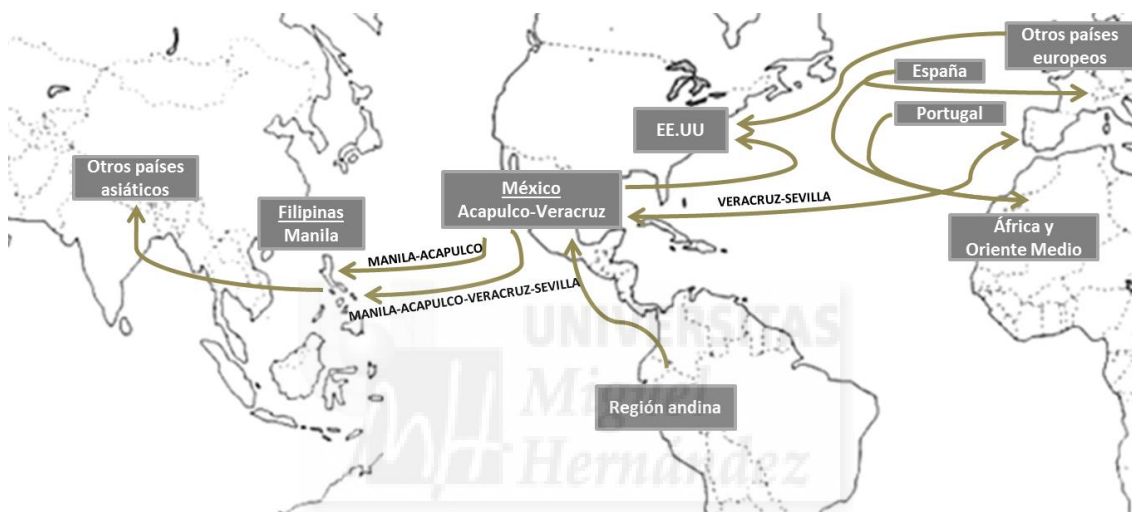


Figura 8. Posibles rutas de propagación del tomate desde el siglo XVI. Adaptado de Esquinas-Alcázar, 1981.

Tras los cambios que se sucedieron con la revolución verde y más recientemente con las nuevas biotecnologías, hoy en día está ampliamente aceptado que la producción de nuevas variedades de plantas para la agricultura y la alimentación, han acabado ocupando un lugar muy destacado en el desarrollo de la actividad económica (Pujol, 2002). La producción de tomate mundial aproximadamente alcanzó 192.317.973 toneladas en 2023, situándose en el décimo lugar de los cultivos primarios después de la caña de azúcar (2.025.797.465 t), maíz (1.241.557.811 t), arroz (799.999.504 t), trigo (798.975.306 t), aceite de nuez de palma (409.151.773 t), patata (383.082.607 t), grano de soja (371.173.609 t), yuca (333.681.193 t) y remolacha azucarera (281.194.638 t) (FAOSTAT, 2025). En América del Norte (Canadá 543.151 t y EE.UU 12.370.057 t) la producción es de 12.913.208 t, siendo inferior en América Central (5.159.575 t) y América del Sur (8.065.056 t). Asia asciende a 120.512.660 t, África a

23.127.794 t, Europa 21.474.751t y Oceanía 379.780 t. En España se alcanzaron en 2023 3.968.460 t, ocupando el segundo lugar, solo superada por Italia con un total de 6.016.050 t (FAOSTAT, 2025). Extremadura (1.550.848 t), Andalucía (1.306.561 t) y Murcia (219.143 t) son las CC.AA españolas con más producción de tomate (MAPA, 2025).

1.2. Reconstrucción de la historia de la domesticación: del tomate silvestre al tomate cultivado

Dónde, cuándo y cómo fue el proceso de domesticación del tomate es una tarea que está en constante estudio. En cierta manera, en el dónde y el cuándo se tiene una aproximación bastante certera (como se ha mencionado anteriormente), aunque existen otras teorías que sustentan otra posibilidad, pero el cómo es probablemente donde más dudas genera, sobre todo por las variantes nuevas que se van añadiendo debido al uso de nuevas herramientas e investigaciones científicas. Es decir, a partir de una teoría fundamentada, se van añadiendo otras posibles “teorías” con el transcurso de los años.

1.2.1. El tomate cultivado (*Solanum lycopersicum* L.) y sus especies silvestres relacionadas

Una de las primeras teorías en relacionar los organismos domesticados con los silvestres fue la de Charles Darwin, exponiendo que las plantas y animales domesticados tienen ancestros silvestres, alejándose en el tiempo por efecto de la selección humana (Darwin, 1859; Darwin, 1868). Entender la domesticación nos acerca a la historia de la diversidad, la cual constituye la base fundamental para desarrollar acciones frente al presente/futuro escenario del cambio global (Casas et al., 2019). Por tanto, debemos conocer las especies silvestres relacionadas con el tomate cultivado. El tomate pertenece a la familia Solanaceae, género *Solanum* L. y sección *Lycopersicon* (Blanca et al., 2012). Los parientes silvestres del tomate cultivado se limitan al oeste de Sudamérica, desde el norte de Chile hasta el sur de Colombia, siendo el límite occidental la costa del Pacífico (incluidas las islas Galápagos) y el límite oriental posiblemente las estribaciones inferiores de los Andes (Rick, 1973). Según los registros las exploraciones y recolecciones de germoplasma de tomate se remontan al menos a 1778. La primera gran exploración específica de tomate fue llevada a cargo por Blood y Tremelling (Esquinas-Alcázar, 1981). Esta

expedición surge por el gran interés de los programas de mejora genética de tomate para desarrollar variedades comerciales resistentes a enfermedades. La demanda de las especies silvestres como recurso genético puso de manifiesto la gran confusión que había sobre la nomenclatura y los conceptos filogenéticos, y unido a la escasez de material de herbario disponible y la tendencia de casi ningún espécimen de la misma especie a parecerse, fomentó su estudio con más profundidad (Muller, 1940). A finales de 1937, la Division of Plant Exploration and Introduction del United States Department of Agriculture encargó a H. L. Blood, asistido por Louis Tremelling, una expedición por la costa occidental de Sudamérica y por el interior, donde desde diciembre de 1937 hasta mayo de 1938 recolectaron 460 especímenes de herbario y muestras de semillas de las diversas especies. Las colecciones representaban una latitud considerable de variación dentro de cada una de las especies conocidas, excepto *Lycopersicon cheesmanii* Riley de las Islas Galápagos, que no se da en el continente. Con la excepción de algunos ejemplares de *Lycopersicon esculentum* y *L. esculentum* var. *cerasiforme* (Dun.) Gray, la mayoría de estas colecciones se cultivaron en el United States Plant Introduction Garden en Glenn Dale, Maryland, durante el verano de 1938, donde se estudiaron en campo y se hicieron especímenes de herbario adicionales. El estudio de un volumen tan grande de material dio lugar a una mejor comprensión de las relaciones de la especie. Posteriormente se realizaron estudios del United States National Herbarium, los herbarios del National Arboretum de Estados Unidos, el Nueva York Botanical Garden, o el de la Philadelphia Academy of Natural Sciences, entre otros (Muller, 1940).

Muller (1940) consideró el género *Lycopersicon* como un género distinto y lo dividió en dos subgéneros: *Eulycopersicon*, donde incluyó *L. esculentum* (3 rangos intraespecíficos) y *L. pimpinellifolium*; y *Eriopersicon*, con *L. peruvianum* (3 rangos intraespecíficos), *L. cheesmanii* (2 rangos intraespecíficos), *L. hirsutum* (2 rangos intraespecíficos) y *L. glandulosum*. Tres años más tarde, Luckwill (1943) adoptó las mismas categorías pero reconoció 8 rangos intraespecíficos en *L. esculentum* y 5 en *L. peruvianum*. Casi en la década de los 80, Rick (1979) propone una nueva clasificación infragénica (entre el género y la especie) y reconoce nueve especies clasificadas en dos complejos. El complejo *Esculentum*, donde reconoce *L. esculentum* (2 rangos intraespecíficos), *L. pimpinellifolium*, *L. cheesmaniae*, *L. pennellii*, *L. hirsutum*, *L. chmielewskii* y *L. parviflorum*; y el complejo *Peruvianum* con *L. chilense* (taxon sinónimo de *L. peruvianum*. Luckwill, 1943) y *L. peruvianum* (taxon sinónimo de *L. peruvianum* y *L. glandulosum*. Luckwill, 1943). En 1990, Child propone otra clasificación pero ya tratando las especies

como *Solanum*, diferenciándolas en tres series: en *Lycopersicon* reconoce *S. lycopersicum* (taxon sinónimo de *L. esculentum*. Rick, 1979), *S. pimpinellifolium* (taxon sinónimo de *L. pimpinellifolium*. Rick, 1979) y *S. cheesmaniae* (taxon sinónimo de *L. cheesmaniae*. Rick, 1979); en *Neolycopersicon* incluye *S. pennellii* (taxon sinónimo de *L. pennellii*. Rick, 1979); y en la serie *Eriopersicon*, *S. habrochaites* (taxon sinónimo de *L. hirsutum*. Rick, 1979), *S. chmielewskii* (taxon sinónimo de *L. chmielewskii*. Rick, 1979), *S. chilense* (taxon sinónimo de *L. chilense*. Rick, 1979), *S. peruvianum* (taxon sinónimo de *L. peruvianum*. Rick, 1979) y *S. neorickii* (taxon sinónimo de *L. parviflorum*. Rick, 1979).

Durante el verano de 1980, el IBPGR (International Board for Plant Genetic Resources) apoyó dos misiones para la recolección de especies silvestres de *Lycopersicon*, una en Ecuador junto con la oficina de la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) en Quito y otra en Perú junto con la Universidad Nacional Agraria La Molina en Lima (Perú), dirigidas con científicos locales y con la participación del Dr. C.M. Rick, de la Universidad de California (Esquinas-Alcázar, 1981). En ambos países recolectaron las especies *L. hirsutum* f. *glabratum*, *L. pimpinellifolium*, *L. esculentum* prim. cv, *L. esulentum* var. *cerasiforme*, *L. parviflorum* y *S. ochranthum*; en Ecuador también *S. juglandifolium*; y en Perú *L. peruvianum*, *L. peruvianum* var. *humifusum* y *L. hirsutum*. En este caso no se identificaron *L. cheesmaniae* (se encuentran en las Islas Galapagos), *L. pennellii*, *L. chmielewskii* y *L. chilense* como había reconocido Rick (1979), posiblemente porque *L. chmielewskii* y *L. chilense* se encuentran en el sur de Perú y norte de Bolivia entre 1.200 y 3.000 m.s.n.m y en la costa de Chile y sur de Perú sobre 4.000 m.s.n.m respectivamente, y *L. pennellii* se encuentra del norte de Perú al norte de Chile sobre 4.100 m.s.n.m (Peralta et al., 2008a), y las expediciones se ciñeron al sur de Ecuador y Norte de Perú y no se superaron los 2.500 y 2.800 m.s.n.m respectivamente (Esquinas-Alcázar, 1981). En las figuras 9 y 10 se muestran las rutas y los lugares de recolección de las especies recogidas en agosto de 1980.

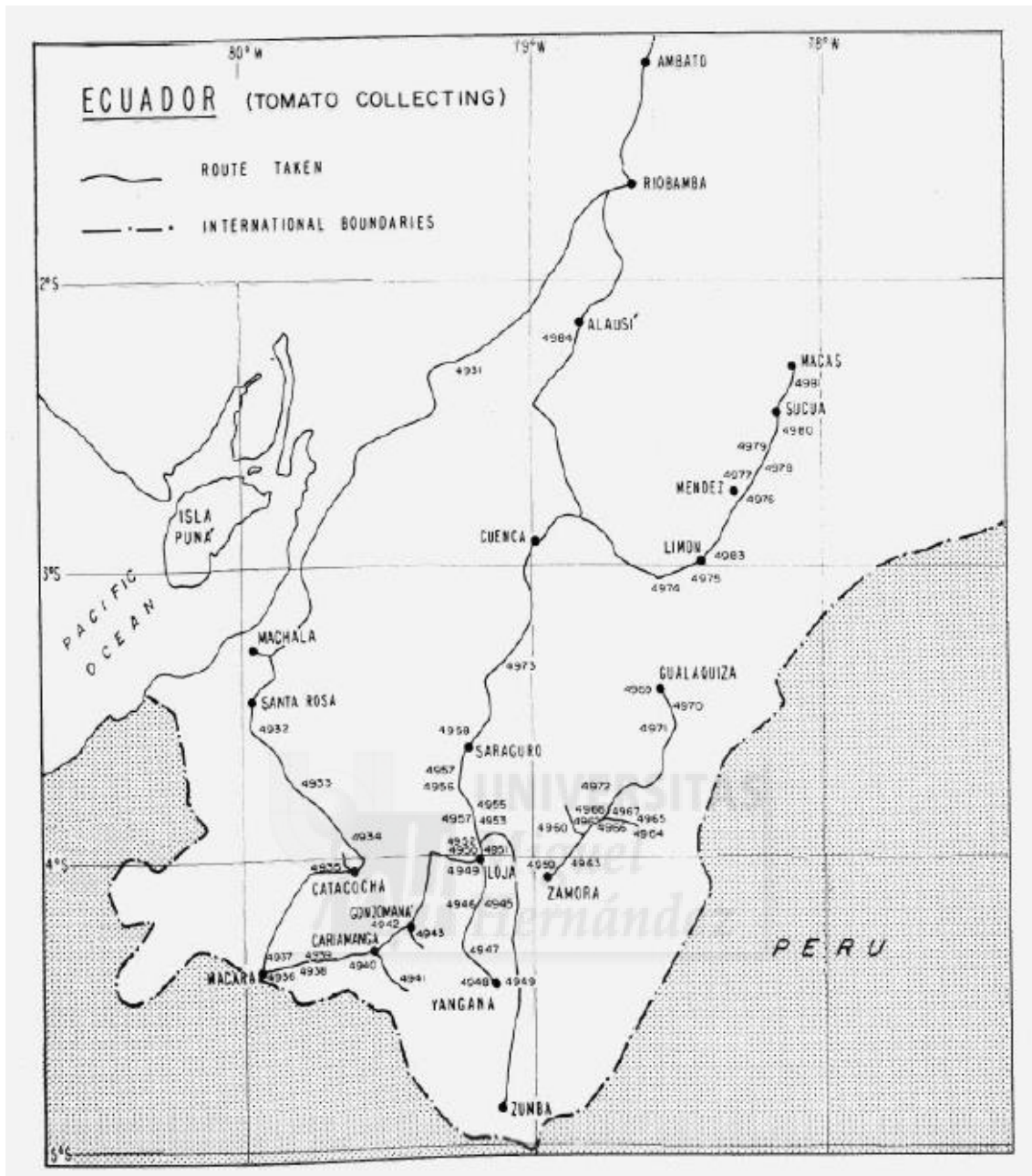


Figura 9. Mapa del sur de Ecuador que muestra la ruta y el lugar de recolección de las accesiones de la expedición de agosto de 1980. Los lugares de colecta se identifican con un número de campo para cada muestra. *L. hirsutum* f. *glabratum* (4931, 4937-4940, 4942-4949, 4953-4955, 4958, 4963, 4967, 4984), *L. pimpinellifolium* (4932, 4935, 4936, 4941, 4950), *L. esculentum* prim. cv (4933, 4961, 4962, 4964-4966, 4968-4972, 4976, 4983), *L. esculentum* v. *cerasiforme* (4934, 4960, 4975, 4977-4982), *L. parviflorum* (4952, 4973) y *S. ochranthum* (4956, 4957), *S. juglandifolium* (4959, 4974). Adaptado de Esquinas-Alcázar, 1981.

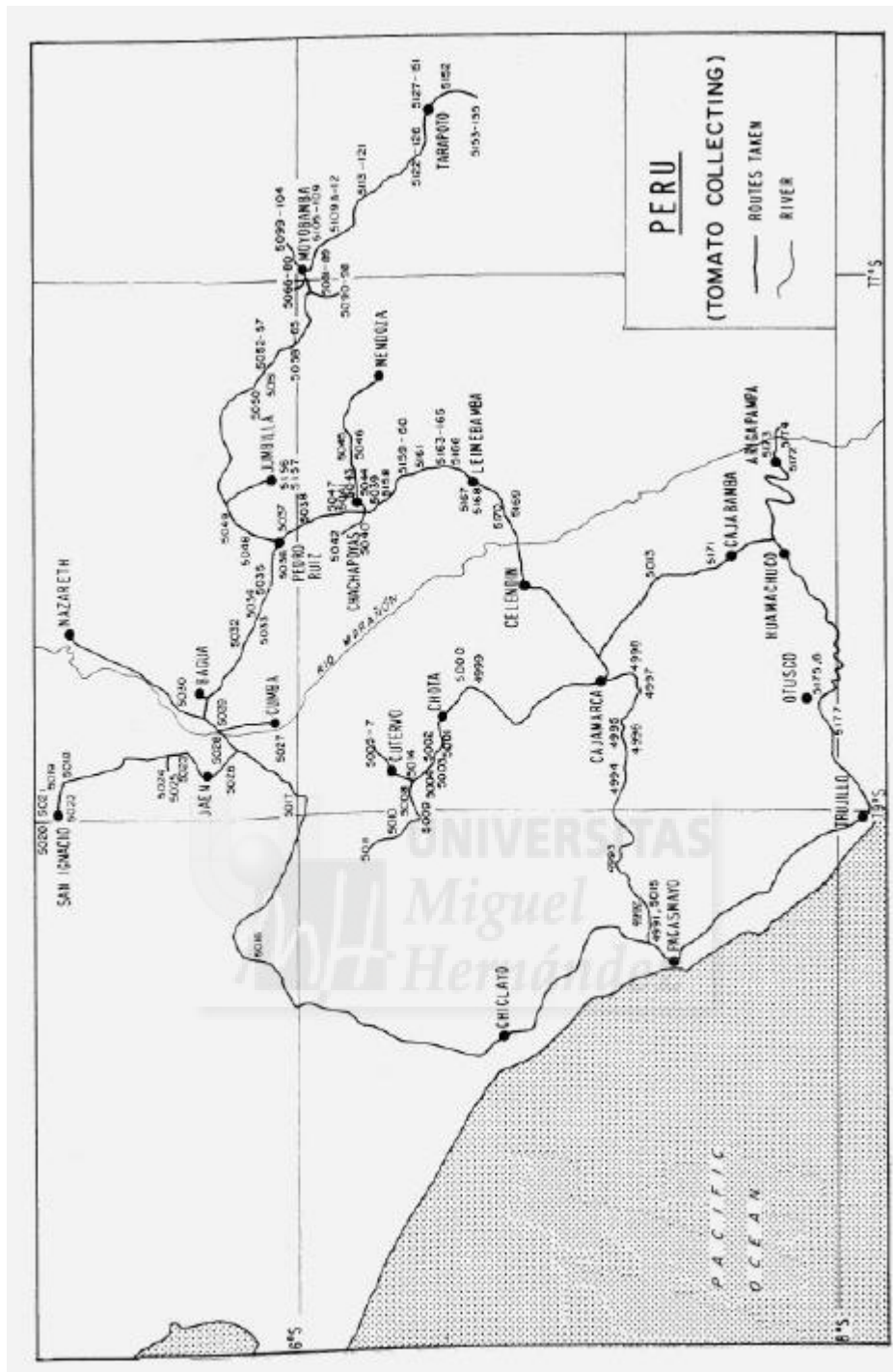


Figura 10. Mapa del norte de Perú que muestra la ruta y el lugar de recolección de las accesiones de la expedición de agosto de 1980. Los lugares de colecta se identifican con un número de campo para cada muestra. *L. hirsutum* f. *glabratum* (5019, 5020, 5041, 5044, 5049, 6158, 6165, 6168), *L. pimpinellifolium* (4991, 4992, 4994, 5015, 5018, 5021, 5023-5029, 5031-5034), *L. esculentum* prim. cv (6127-6151, Tarapoto: mercado), *L. esculentum* v. *cerasiforme* (5022, 5050-6109, 6109A-6126, 6152-6157, 6160), *L. parviflorum* (5035-5040, 5042, 5043, 5045-5047, 6159, 6161-6163, 6169) y *S. ochranthum* (5005-5007, 5010, 5011, 5048, 6164, 6167), *L. peruvianum* (4993, 4995, 5002, 5008, 5009, 5013, 5014, 5017, 5030, 6170-6172, 6174, 6175, 6177), *L. peruvianum* var. *humifusum* (4996-4998) y *L. hirsutum* (4999-5001, 5003, 5004, 5012, 5016, 6166, 6173, 6176). Adaptado de Esquinas-Alcázar, 1981.

Con el transcurso de los años estas clasificaciones van quedando obsoletas a medida que ha aumentado el número de especies y razas recolectadas en América del Sur (Rick, 1971; Holle et al., 1978; Holle et al., 1979; Taylor, 1986; Rick, 1991; Peralta y Spooner, 2001). La delimitación y las relaciones de las especies de tomate han diferido ampliamente dependiendo de si se consideran más importantes los conceptos de especie morfológicos o biológicos (Spooner et al., 2005). Además de estudiar la variabilidad genética en todos los niveles taxonómicos, distribución geográfica, citología cromosómica comparativa, viabilidad o fertilidad (Rick, 1979), las relaciones filogenéticas se han estudiado ampliamente utilizando varios marcadores moleculares (Blanca, et al., 2012), ADNcp (Palmer y Zamir, 1982), ADNmt (McClean y Hanson, 1986), RFLPs nucleares (Miller y Tanksley, 1990) y AFLPs (Spooner et al., 2005; Zuriaga et al., 2009). También se han empleado datos de secuencias como ITS ADNr (Marshall et al., 2001), GbSSI gene (Peralta y Spooner, 2001) y dos genes nucleares (Zuriaga et al., 2009). Durante varios años se han examinado las relaciones filogenéticas de las especies de los tomates silvestres y grupos externos estrechamente relacionados (Spooner et al., 2005; Peralta et al., 2005; Peralta y Spooner, 2005; Peralta et al., 2006). En 2016, Sandra Knapp e Iris Edith Peralta publican un artículo donde revisan la historia taxonómica y filogenética y las relaciones y la taxonomía a nivel de especie del tomate cultivado y sus parientes silvestres, exponiendo que aunque *Solanum lycopersicum* L. se reconoció anteriormente como *Lycopersicum esculentum* Mill., la mayoría de los taxónomos, la mayoría de los fitomejoradores y otros usuarios, han aceptado la reintegración de los tomates a *Solanum* (Caicedo y Schaal, 2004; Fridman et al., 2004; Schauer et al., 2006; Mueller et al., 2005; Tomato Genome Consortium, 2012; Peralta et al., 2008a). Para dejar una posición clara de la clasificación actual del tomate cultivado y sus parientes silvestres, en la Tabla 1, se muestra la sección *Lycopersicon* junto con sus 12 parientes silvestres y otras cuatro especies de las secciones *Juglandifolia* y *Lycopersicoides* que se consideran tradicionalmente como parientes silvestres del tomate. La Figura 11 recoge un mapa de distribución de los parientes silvestres del tomate. Cabe decir, que los tomates y sus parientes cercanos se distinguen fácilmente de cualquier otro grupo de especies de *Solanum* por sus flores de color amarillo brillante (a excepción de *S. rostratum* Dunal y *S. huayavillense* Del Vitto) y hojas pinnadas o pinnatífidas, no espinosas (Knapp y Peralta, 2016).

Tabla 1. Tomates y sus parientes silvestres (Peralta et al., 2008a; El grupo Lycopersicon corresponde a las especies de frutos rojos y anaranjados). Adaptado de Knapp y Peralta, 2016.

Sección <i>Lycopersicon</i>	
Grupo Lycopersicon	
Hierbas medicinales de <i>S. lycopersicum</i> L.	Cultivado y domesticado a nivel mundial. 0-4.000 m.s.n.m
<i>S. pimpinellifolium</i> L.	Suroeste de Ecuador hasta el norte de Chile (muchas poblaciones del norte de Ecuador estan mezcladas con <i>S. lycopersicum</i> ; Peralta et al., 2008a,b; Blanca et al., 2012). 3.000 m.s.n.m
<i>S. cheesmaniae</i> (L. Riley) Fosberg	Islas galápagos. 1.300 m.s.n.m
<i>S. galapaguense</i> SCDarwin y Peralta	Islas galápagos. 1.600 m.s.n.m
Grupo Neolycopersicon	
<i>S. pennellii</i> Correl	Del norte de Perú al norte de Chile. 4.100 m.s.n.m
Grupo Eriopersicon	
<i>S. corneliomulleri</i> JF Macbr.	Sur de Perú (Lima hacia el sur). 20-4.500 m.s.n.m
<i>S. peruvianum</i> L.	Del centro de Perú al norte de Chile. 3.000 m.s.n.m
<i>S. habrochaites</i> S. Knapp y D.M. Spooner	Ecuador y Andes Peruanos. 10-4.100 m.s.n.m
<i>S. huaylasense</i> Peralta	Cuenca del río Santa, centro-norte de Perú. 950-3.300 m.s.n.m
<i>S. chilense</i> (Dunal) Reiche	Costa de Chile y sur de Perú. 4.000 m.s.n.m
Grupo Arcanum	
<i>S. arcanum</i> Peralta	Norte de Perú. 100-4.000 m.s.n.m
<i>S. chmielewskii</i> (C.M. Rick, Kesicki, Fobles y M. Holle) D.M. Spooner, J.G. Anderson y R.K. Jansen	Sur de Perú y norte de Bolivia. 1.200-3.000 m.s.n.m
<i>S. neorickii</i> D.M. Spooner, J.G. Anderson y J.K. Jansen	Del sur de Ecuador al sur de Perú. 500-3.500 m.s.n.m
Sección <i>Lycopersicoides</i>	
<i>S. lycopersicoides</i> Dunal	Sur de Perú y norte de Chile. 1.250-3.600 m.s.n.m
<i>S. sitiens</i> I.M. Johnst	Norte de Chile. 2.000-3.500 m.s.n.m
Sección <i>Juglandifolia</i>	
<i>S. juglandifolium</i> Dunal	Colombia, Ecuador y Andes Peruanos. 1.000-3.200 m.s.n.m
<i>S. ochranthum</i> Dunal	Colombia, Ecuador y Andes Peruanos. 1.850-4.100 m.s.n.m

*Para más detalles sobre la cruzabilidad y otros parámetros biológicos de los tomates silvestres, véase Grandillo et al., 2011.

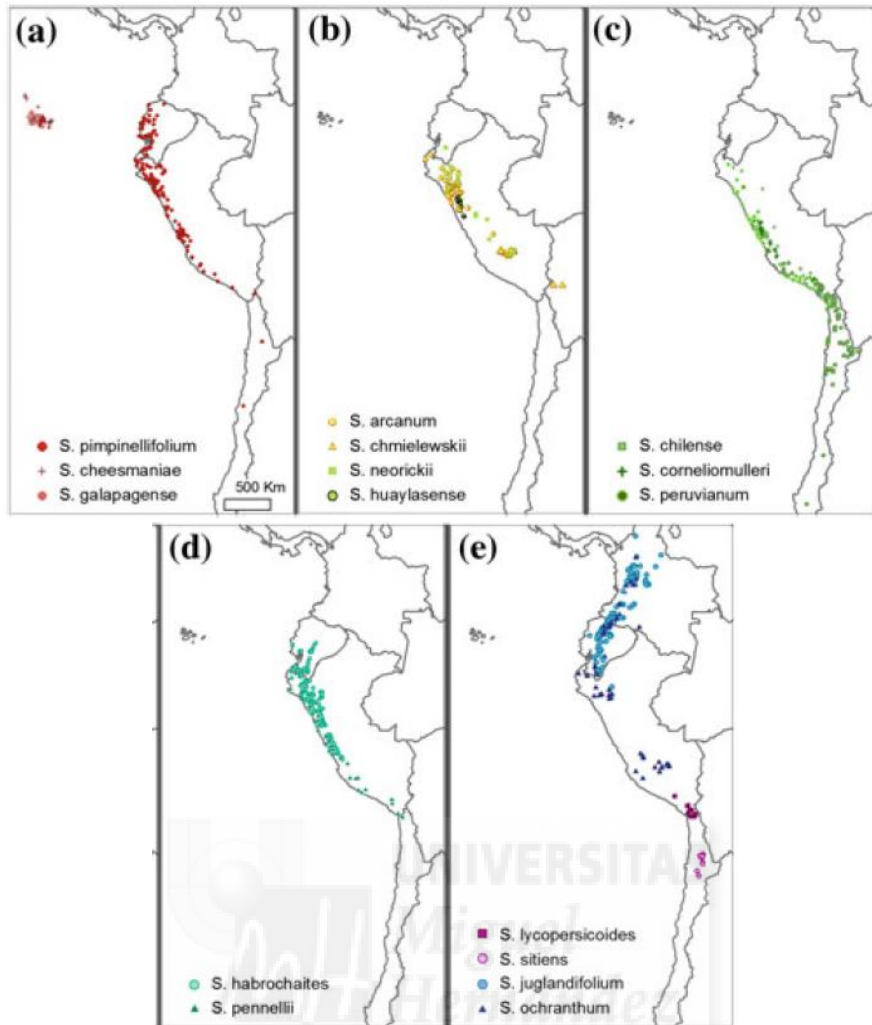


Figura 11. Mapa de distribución de los parientes silvestres del tomate. Knapp y Peralta, 2016.

1.2.2. Trayectoria evolutiva de los rasgos de la domesticación y la mejora

Los primeros registros históricos sobre los procesos de domesticación son escasos, siendo los cronistas españoles los primeros en documentar el cultivo y consumo del tomate en Mesoamérica (Long, 1995). Las teorías clásicas del paso del tomate silvestre al tomate cultivado mediante el proceso de domesticación ponen el foco en *S. pimpinellifolium* y *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (Blanca et al., 2012). Algunos autores consideran que *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* es el ancestro del tomate cultivado, *S. lycopersicum* (Rick, 1974; Rick, 1976; Villand et al., 1998). Sin embargo, otros autores consideran que *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* es una mezcla de *S. pimpinellifolium* y *S. lycopersicum* (Nesbitt y Tanksley, 2002). Si generalmente se parte de la base de que la domesticación viene dada en dos pasos, de *S. pimpinellifolium* (tamaño de un arándano) a *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (tamaño de una cereza) y de este a *S. lycopersicum*

(tamaño de frutos grandes) (Lin et al., 2014), existiría la posibilidad de un modelo en el que tuvo lugar una pre-domesticación en la región andina para después completar la domesticación en Mesoamérica (Rick y Holle, 1990; Blanca et al., 2012; Blanca et al., 2015). Rick y Holle (1990) expusieron que *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (*L. esculentum* var. *cerasiforme*) y biotipos estrechamente relacionados con la especie se distribuyen ampliamente con formas silvestres o asilvestradas en las estribaciones andinas orientales de la Ceja de la Montaña, Perú y áreas equivalentes de Bolivia y Ecuador, y según ensayos de variación alozímica en 20 loci y 5 loci relacionados con la morfología, los andes orientales podrían ser un centro secundario de variabilidad.

En 1995 Alpert et al., demostraron que un QTL principal que controla el peso del fruto (*fw2.2*) se asignaba a la misma posición en el cromosoma 2 tanto en la especie de tomate silvestre de fruto verde *S. pennellii* como en la especie silvestre de fruto rojo *S. pimpinellifolium*. En una línea de introgresión F₂ derivada de *S. lycopersicum* x *S. pennellii* y en una población de retrocruzamiento BC₁ derivada de *S. lycopersicum* x *S. pimpinellifolium* posicionan *fw2.2* cerca de los marcadores TG91 y TG167. En 1999 identifican un conjunto de 28 QTLs posibles responsables del tamaño del fruto basándose en estudios anteriores. Seis QTLs (*fw1.1*, *fw2.1*, *fw2.2*, *fw3.1*, *fw3.2* y *fw11.3*) con el 22% de la variancia fenotípica explicada se identifican como responsables de la mayor parte de la variación del tamaño del fruto en la evolución del tomate, siendo el responsable principal el *fw2.2* (Grandillo et al., 1999). Este QTL parece ser el responsable de una transición clave durante la domesticación: todas las especies silvestres de *Solanum* examinadas (por lo menos hasta la fecha del estudio, 2000) contienen alelos de fruto pequeño en este locus mientras que los cultivares modernos tienen alelos de fruto grande (Frary et al., 2000). Además, señalan que *fw2.2* corresponde a un ORFX que se expresa en los órganos florales antes de la antesis. En el mapeo de alta resolución de *fw2.2* QTL (Figura 12) señalaron que ORFX o una región aguas arriba es la causa probable del fenotipo QTL *fw2.2*, puesto que las mutaciones genéticas causantes del cambio del tamaño del fruto deben estar a la izquierda de XO33. Continuando con los estudios de *fw2.2*, Nesbitt y Tanksley (2002) aplicando técnicas filogenéticas y genéticas de poblaciones para determinar la naturaleza y el origen de las mutaciones en este QTL, secuenciaron una serie de alelos en *fw2.2* en accesiones de tomate moderno, *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* y *S. pimpinellifolium*. Los resultados de este estudio sugieren que el alelo de fruto grande *fw2.2*, ahora fijado en la

mayoría de los tomates cultivados, surgió en el germoplasma del tomate mucho antes de la domesticación en función de las estimaciones basadas en el reloj molecular. También indican que las accesiones de *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*, la subespecie que se piensa que es el ancestro silvestre más probable de los tomates domesticados, representan una población diversa que contiene una mezcla de alelos de tomates silvestres y cultivados que sugiere que la subespecie puede derivar de hibridaciones entre formas domesticadas de *S. lycopersicum* y formas silvestres de *S. pimpinellifolium* en lugar de un paso de transición de tomates silvestres a domesticados. En este caso, a pesar del hecho de que las accesiones de *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* son polimórficas para los alelos de frutos grandes y pequeños en *fw2.2*, no se detectó ninguna asociación significativa entre el tamaño del fruto y los genotipos *fw2.2* de las subespecies, lo que sugiere la implicación de otros QTLs de peso del fruto en la variación del peso del fruto en *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (Nesbitt y Tanksley, 2002). La clonación de *fw2.2* ha demostrado que este locus codifica un represor negativo de la división celular, y los cambios de fruto de pequeño a grande son causados por mutaciones en la secuencia promotora. Estas mutaciones están asociadas con un nivel de transcripción más bajo de *fw2.2* durante la fase de división celular del desarrollo del fruto, así como un cambio en el momento de la expresión (Cong et al., 2002). *fw3.2* es un QTL importante en relación al peso del fruto de tomate que explica el 19% de la varianza de la masa del fruto en una población F₂ derivada de un cruce entre el cultivar Yellow Stuffer (tipo pimiento para rellenar) y la accesión LA1589 de la especie silvestre *S. pimpinellifolium* (van der Knapp y Tanksley, 2003). *fw3.2* se mapeo en un intervalo de 51,4 kb correspondiente a una región que comprende siete genes candidatos (Zhang, et al., 2012). A partir de este mapeo, Chakrabarti et al. (2013) realizaron otro delimitando *fw3.2* en una región de 24,4 kb para la clonación del gen subyacente. Tres proteínas se presentaron como candidatas: un citocromo P450 (*OFR6*) perteneciente a la subfamilia CYP78A, un transportador ABC (*ORF7*) distantemente relacionado con los transportadores PGP y una proteína que contienen el dominio Kelch de función desconocida (*ORF8*). Identificando polimorfismos que se relacionaron con el tamaño del fruto, se seleccionaron 6 SNP (M42, M9, M53, M60, M74, y M82), todos ubicados en la región ascendente de *OFR6* y *ORF7* menos uno (Figura 13). Asumieron que *ORF6* subyace al locus *fw3.2* y lo renombraron *SIKLUH* en honor a uno de los miembros fundadores de esta subfamilia de P540s, y aunque la mutación M9 parece ser la más prometedora para regular la masa de la fruta, no se puede

excluir el papel de otros tres SNP (M60, M74 y M82) en la regulación de la masa de la fruta, y tampoco pueden excluirse los SNP adicionales que se puedan encontrar en las regiones restantes que no fueron secuenciadas. Los autores también sugieren en este estudio que el alelo que da lugar a frutos grandes también surgió en las primeras domesticaciones del tomate y se volvió progresivamente más abundante en selecciones posteriores (Chakrabarti et al., 2013).

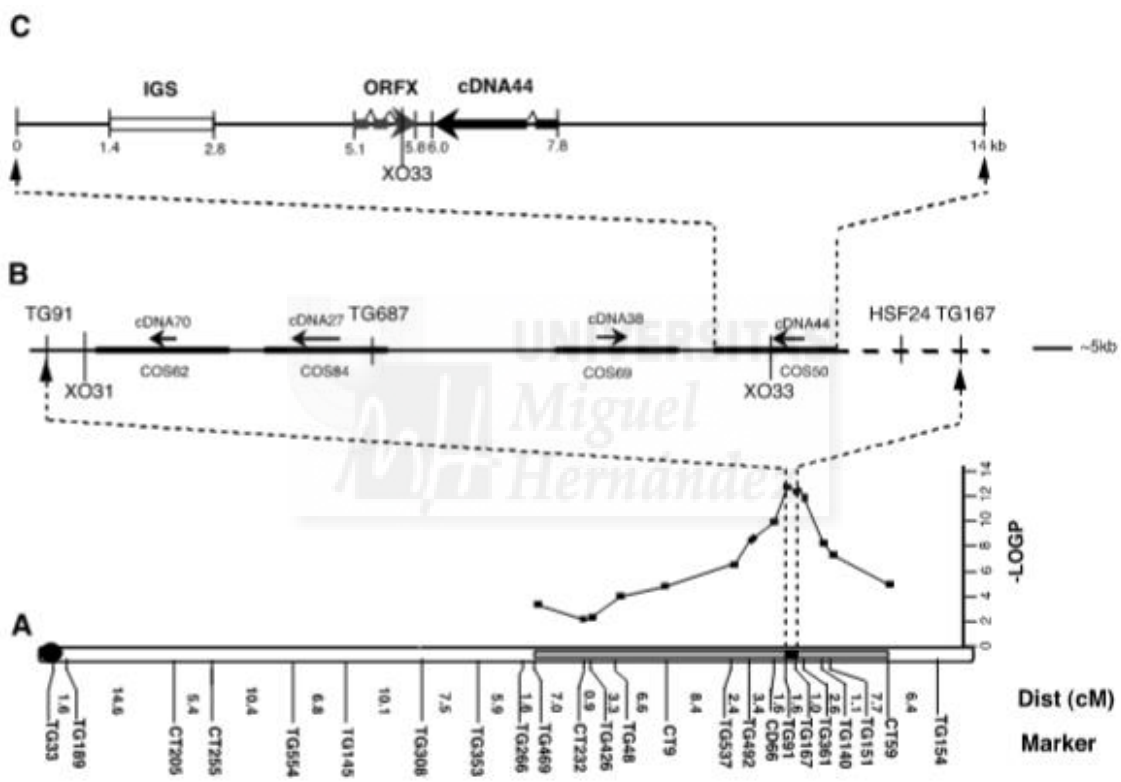


Figura 12. Mapeo de alta resolución del QTL *fw2.2*. A, localización de *fw2.2* en el cromosoma 2 de un cruce entre *S. lycopersicum* y una línea casi isogénica (NIL, Near Isogenic Line) con una pequeña introgresión (área gris) de *S. pennellii*. B, representación contigua de la región candidata *fw2.2* delimitada por eventos de recombinación en XO31 y XO33. Las flechas representan los cuatro ADNc candidatos originales (70, 27, 38 y 44) y las barras horizontales gruesas son los cuatro cósmidos (cos62, 84, 69 y 50) aislados con estos ADNc como sondas. Las líneas verticales son las posiciones de los marcadores de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (CAPs). C, Análisis de la secuencia de cos50, incluidas las posiciones de ADNc44, ORFX, la región de repetición rica en A-T y el evento de recombinación más a la derecha XO33. Adaptado de Frary et al., 2000.

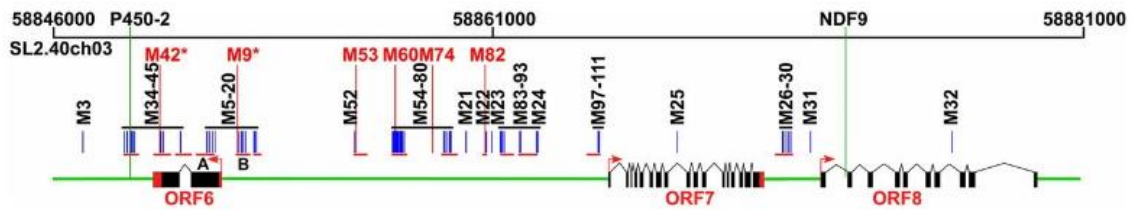


Figura 13. Estructura del genoma del locus *fw3.2* y mapeo de asociación de los polimorfismos. Se representan con cuadros rojos los UTR, con cuadros negros los exones, con líneas negras los intrones y las líneas verdes corresponden con las regiones intergénicas. La dirección de la transcripción se indica con flechas rojas. Las líneas verticales azules representan polimorfismos no asociados con la masa del fruto. Dos SNP altamente significativos se representan con un asterisco. Las líneas horizontales rojas representan las regiones secuenciadas. Dos marcadores, P450-2 y NDF9, que delimitaron el locus *fw2.2* a la región de 2,4 kb, se muestran con líneas verticales verdes. Adaptado de Chakrabarti et al., 2013.

Los frutos de las especies domesticadas generalmente han sido más grandes que los que se encuentran en las especies silvestres. Por ejemplo, el supuesto ancestro silvestre del tomate, *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*, da frutos compuestos por dos lóculos y su peso es de unos pocos gramos. En contraste, un fruto de una variedad moderna puede contener muchos lóculos y pesar hasta 1 kg (Tanksley, 2004). Como se ha mencionado anteriormente, se han identificado algunos QTLs para la masa del fruto, incluidos varios genes que fueron clonados. Sin embargo, sigue siendo difícil determinar si estos QTL y genes se seleccionaron durante la domesticación o la mejora (Lin et al., 2014). En un estudio más reciente (Razifard et al., 2020) los autores siguen en la misma línea que el resto, sugieren que el origen de *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* puede ser anterior a la domesticación, y que muchos rasgos considerados típicos de los tomates cultivados surgieron en *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* sudamericano, pero se perdieron o disminuyeron una vez que estas formas parcialmente domesticadas se extendieron hacia el norte. Es probable que estos rasgos se hayan vuelto a seleccionar de manera convergente en el tomate cultivado común, antes de su expansión por todo el mundo. En la Figura 14 se muestra un resumen esquemático de los QTL que supuestamente han intervenido en las dos etapas de agrandamiento del fruto.

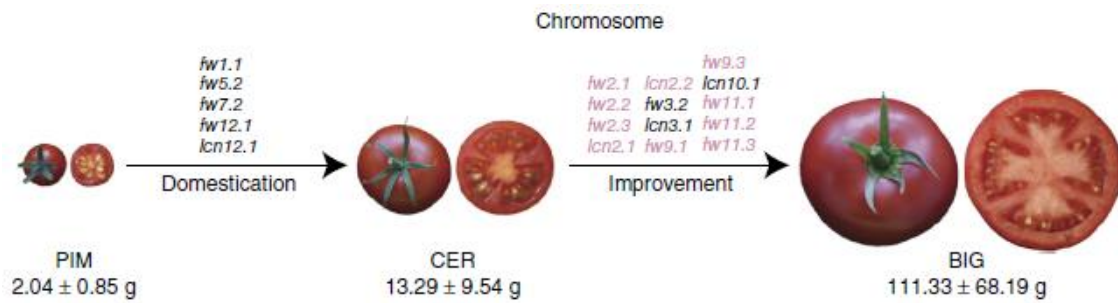


Figura 14. Evolución en dos pasos del tamaño del fruto de tomate. Se muestran los QTLs que supuestamente fueron seleccionados durante la domesticación y la mejora. *fw1.1*, *fw5.2*, *fw7.2*, *fw12.1* y *lcn12.1* se atribuyen a genes relacionados con la masa del fruto que probablemente contribuyeron al agrandamiento de los frutos durante la domesticación, el resto durante el proceso de mejora. Adaptado de Lin et al., 2014.

La masa del fruto es el rasgo clave de la selección humana en el tomate, ya que afecta tanto al rendimiento como a la calidad (Lin et al., 2014), pero la forma del fruto es otra de las características marcadas por la domesticación (Bai y Lindhout, 2007). Desde el siglo XX, los seres humanos han creado una gran variedad de cultivares y formas morfológicamente diferentes a partir *S. lycopersicum*, desarrollando variedades modernas de tomate (en su mayoría híbridos) con todas las formas, colores y tamaños. La domesticación del tomate experimentó un severo cuello de botella genético a medida que el cultivo se transportaba desde los Andes a América Central y de allí a Europa. En una especie predominantemente endogámica, la variación genética tiende a disminuir, incluso sin selección. En consecuencia, la deriva genética es un proceso importante que reduce la variación genética (Bai y Lindhout, 2007). Los caracteres que probablemente se han seleccionado durante la domesticación del tomate fueron el peso del fruto y, en menor medida, la forma (Blanca et al., 2015), pero la selección para un mayor tamaño del fruto puede haber llevado a cambios fenotípicos en la forma del fruto por efectos pleiotrópicos de los loci del tamaño del fruto o la expresión de alelos de forma de fruto "ocultos", que tienen poco o ningún efecto visible en la forma del fruto en un fondo de frutos pequeños (Tanksley et al., 1996; Grandillo et al., 1999). Se han clonado cuatro genes que controlan la forma del fruto del tomate. *SUN* y *OVATE* controlan la forma alargada, mientras que *FASCIATED* (*FAS*) y *LOCULE NUMBER* (*LC*) controlan el número de lóculos del fruto y la forma plana. Las variedades de tomate se han clasificado en función de la morfología del fruto en categorías de forma, descritas por la Unión Internacional para la Protección de las

Obtenciones Vegetales y el Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, achatado, ligeramente achatado, redondeado, redondo-alargado, cordiforme, cilíndrico, piriforme, elipsoide o pimiento. La distribución de alelos *SUN*, *OVATE*, *LC* y *FAS* está fuertemente asociada con la clasificación de la forma del fruto. La diversidad en la morfología de los frutos en el germoplasma cultivado se explica en gran medida por mutaciones en los genes *SUN*, *OVATE*, *LC* y/o *FAS* (Rodríguez et al., 2011) (individualmente, los alelos de estos genes explican hasta el 71% de la variación observada para atributos específicos de la forma del fruto. Rodríguez et al., 2011). La selección de diversas formas de fruta jugó un papel crítico en la domesticación del tomate, las mutaciones de los genes de la forma del fruto, ya sean mantenidas por curiosidad, con fines culturales y culinarios o para desarrollar variedades de alto rendimiento y formas únicas, desempeñaron un papel clave en la selección del tomate y siguen siendo muy relevantes en la actualidad. En la Figura 15 se explica el modelo de la evolución de la variación de la forma del fruto de tomate de forma clara y resumida (para información más detallada de este estudio ver Rodríguez et al., 2011). Aunque el tomate es una especie modelo para la biología vegetal y la mejora genética, la naturaleza de la selección humana que alteró su genoma sigue siendo en gran medida desconocida (Lin et al., 2014). Las complejidades en las etapas intermedias de la historia de la domesticación del tomate sugieren un muestreo más amplio y un mayor cuidado en la definición de las poblaciones consideradas intermedias en la historia de la domesticación de cualquier cultivo (Razifard et al., 2020).

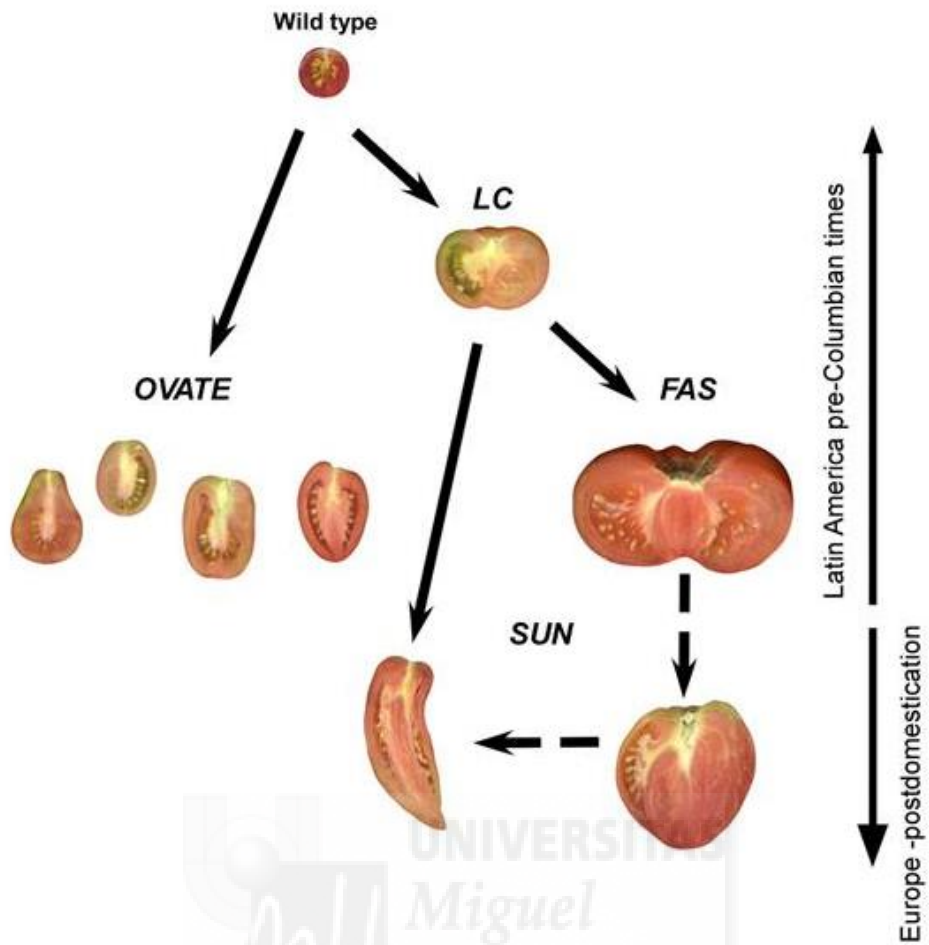


Figura 15. Modelo de la evolución de la variación de la forma del fruto de tomate. La domesticación del tomate probablemente ocurrió en América Latina a partir de accesiones de tomate silvestre redondo *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*. *LC* surgió primero en el fondo *cerasiforme*, lo que dio como resultado tomates redondos o planos. La mutación *OVATE* surgió en una población ancestral diferente a la de *LC*, pero también en el fondo *cerasiforme*, lo que dio como resultado un fruto elipsoide. *FAS* surgió en el fondo *cerasiforme LC* casi al mismo tiempo que *OVATE*, lo que dio como resultado un fruto plano y muy loculado. La presencia de los alelos mutantes *OVATE*, *LC* y *FAS* en el germoplasma latinoamericano sugiere que surgieron temprano o antes de la domesticación del tomate. La mutación *SUN* surgió después de la domesticación en Europa, muy probablemente en el fondo *LC* de un tomate cultivado (*S. lycopersicum*) y dio como resultado un fruto largo. También es posible que *SUN* surgiera en el fondo mutante *LC* y *FAS*, lo que dio como resultado un fruto de corazón de buey. Rodríguez et al., 2011.

1.3. Variedades tradicionales e híbridas: problemas y soluciones frente a la pérdida de diversidad

Con la llegada del tomate a Europa fueron varios los tipos y caracteres que llegaron al viejo mundo, pero una vez aquí, el cultivo tuvo que adaptarse a las nuevas condiciones, ciclos productivos y a los usos y gustos o preferencias de los nuevos cultivadores dando lugar al segundo origen de nuevas formas y tipos de una reciente agrobiodiversidad. Esta diversidad genética fue la base de la agricultura y la alimentación hasta casi la mitad del siglo XX, basada en el trabajo de generaciones de agricultores y caracterizada por la producción al aire libre, estacionalidad de las cosechas y la cercanía de los lugares de producción y consumo. Dicho lo cual, los cultivos en general, y el tomate en particular, produjeron variedades adaptadas a las condiciones ambientales de las diferentes zonas de producción junto con los gustos y preferencias de los numerosos pueblos y familias productoras (Lázaro et al., 2014). Fuera como fuere, la agricultura pudo fundamentarse porque las modificaciones producidas en el material silvestre se transmitieron de generación en generación, aunque el ser humano no supiera la razón. Esa transmisión genética en diferentes ambientes climáticos, edáficos y culturales es la que da lugar a las variedades y razas locales. A partir de poblaciones locales de baja producción (los agricultores antiguos nunca buscaron el máximo rendimiento, sino el mínimo riesgo: preferían que fuera bajo pero constante a uno alto y anárquico), bastaba un sencillo trabajo de selección con ideas claras del tipo a conseguir y buena capacidad de observación para llegar a un buen resultado, a nuestras variedades tradicionales (Cubero, 2016). A finales del siglo XIX también hay numerosas variedades tradicionales o *heirloom* en EE.UU que se diferencian en tamaño, forma y color (Bai y Lindhout, 2007). En la Tabla 2 se enumeran las variedades tradicionales de cuatro países del sur de Europa y EE.UU. En la Figura 16 se muestra una representación de algunas variedades tradicionales.

Tabla 2. Variabilidad tradicional europea de tomates presentes en mercados locales. Esta diversidad es escasamente utilizada fuera de las áreas de cultivo tradicionales o en los programas de mejora modernos. Adaptado de Pons et al., 2022.

España	Francia	Italia	Grecia
Muchamiel	Marmande Ancienne	Invernale	Areti
De la pera	Coeur du bouef	Canestrino	Pera maritika
Tomate pimiento	Reine des precoces	Mezzo tempo	Lemonia
Tomate moruno	Tomate Jaune	Pera d'Abruzzo	Makedonia
Tomate Bombeta	Noire charbonneuse	Scatolone di Bolsena	Karambola
Rosa de Barbastro	Poire Jaune	Pomodoro di Sorrento	Santorini
De penjar mil flors	Poivron Jaune	San Marzano (Kiros)	
De penjar bombeta	Poivron Rouge	Pomodoro Sinacori	
Pera de Girona	Tomate Corse	Corbarino	
Montserrat		Pomodorino vesuvio	
Ramellet de branca llarga			
Valenciano del Perelló			
Tres cantos			
Tomate moruno de Avellanar			
Tomate Amarillo de Ademuz			

*Variedades tradicionales (*heirloom*) de tomate en EE.UU: 1884 (Ohio), 1884 purple (Ohio), Abraham Lincoln (Illinois), African Queen (Carolina del Norte), Brandywine Sudduth (Tennessee), Claude Brown's Yellow Giant (Kentucky), Chiapas Wild (sur de México), Creole (Louisiana). TomatoFest, 2024.



Figura 16. Variabilidad tradicional de algunas variedades de tomate. De arriba hacia abajo: Coeur du bouef, Montserrat, Moruno, Pimiento, Rosa de Barbastro y Amarillo de Ademuz. BAGERIM, Banco de Germoplasma del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Medioambiental.

El redescubrimiento sobre el año 1900 de las leyes de Mendel proporcionó oportunidades para promover nuevos métodos de mejoramiento. En la década de 1960, con la gran cantidad de nuevos cultivares de alto rendimiento y prácticas agronómicas asociadas como parte de la Revolución Verde, sostenida como necesaria para abordar el hambre, la estabilidad económica y asegurar alianzas políticas, comenzaron a surgir inquietudes sobre las pérdidas de diversidad de los cultivos. Es decir, se estaba acelerando la sustitución de las razas locales. A partir de aquí es cuando aparece el término de “erosión genética” por parte de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) para describir esta pérdida de recursos genéticos, por ser fundamentales para abordar los imprevistos presentes y futuros de la mejora vegetal que ya estaban teniendo presencia (sobre todo después de la epidemia del “Tizón del sur del maíz” de 1970 en EE.UU. Paliwal, 2001), como la susceptibilidad a plagas y enfermedades de los cultivares modernos debido a su uniformidad genética (Khoury et al., 2022). No se sabe exactamente cuándo se acuñó por primera vez el término erosión genética, pero probablemente en algún momento de la década de 1960 se utilizó por primera vez para describir el proceso de pérdida de diversidad genética en la agricultura (Pistorius, 1997). Según cuenta Hanelt et al. (2012), la primera aparición del término “erosión genética” fue en la famosa primera Conferencia Técnica de la FAO en 1967, coordinada por la genetista Erna Bennett, la cual elaboró la idea de la conservación genética. Erna, se unió a la organización en 1967 hasta su dimisión en 1982, por la creencia de que el valioso e irremplazable germoplasma de las razas locales estaba en peligro no solo por la simple erosión genética sino también por poderosos intereses privados. En la década de los años 80 la FAO había anunciado que tres cuartas partes de la diversidad de cultivos previamente cultivados habían desaparecido de los campos desde primeros de siglo (FAO, 2017).

El término erosión genética es acuñado por los científicos para describir *la pérdida de genes y de combinaciones de genes, como los presentes en las variedades adaptadas localmente*. La causa principal de la erosión genética es la sustitución de las variedades locales por las modernas, además de la reducción de variedades cultivadas por la introducción de variedades comerciales en los sistemas de cultivo tradicionales y otras causas como la aparición de plagas y enfermedades o el cambio climático, entre otros (FAO, 2025). Un ejemplo de definición podría ser *“la pérdida de diversidad genética de una especie”* (Carrillo, 2016). Ante esta preocupación aparecieron los programas nacionales e

internacionales para recolectar y mantener la diversidad genética de los cultivos en bancos de genes (Plucknett et al., 1987). El Consejo Internacional de Recursos Fitogenéticos (IBPGR) se estableció en 1974 para coordinar un programa global para conservar la diversidad amenazada antes de que desapareciera. Apoyó la recolección de más de 200.000 muestras de razas locales, parientes silvestres y otros recursos genéticos en 136 países entre 1975 y 1995 y ayudó a establecer colecciones de bancos de genes internacionales para mantener las muestras. Aunque con las razas locales y los parientes silvestres en campo, también existía una preocupación por la vulnerabilidad de los cientos de miles de muestras conservadas *ex situ*, particularmente por la financiación inestable y la infraestructura deficiente, por lo que se propuso a los bancos de genes duplicar sus existencias tanto para mitigar estos desafíos como para proteger los recursos de los desastres naturales, la guerra y los conflictos civiles (Khoury et al., 2022). En 1992, el convenio de Naciones Unidas sobre la Diversidad Biológica (CDB) fue negociado bajo el amparo del Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente y se resolvió en la famosa Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo denominada “Cumbre de la Tierra”, celebrada en Río de Janeiro. El convenio se centra en tres aspectos, la conservación de la diversidad biológica, el uso sostenible de sus componentes y el reparto justo y equitativo de los beneficios derivados de la utilización de los recursos genéticos. España firmó el convenio el 13 de junio de 1992 y lo ratificó el 21 de diciembre de 1993 (Ministerio de España, 2024). Actualmente, los recursos genéticos y sus retos/soluciones se incluyen en el objetivo 15 (vida de ecosistemas terrestres) de la Agenda 2030, pretendiendo conservar la vida de ecosistemas terrestres buscando; proteger y reestablecer los ecosistemas terrestres, gestionar sosteniblemente los bosques, detener e invertir la degradación de las tierras y, *detener la pérdida de biodiversidad* (Naciones Unidas, 2024a). Esperando la llegada del año 2030, los líderes mundiales se reunieron los días 20-23 de septiembre de 2024 en la sede de las naciones Unidas en Nueva York bajo el eslogan “Cumbre del futuro: nuestra agenda común”, con el objetivo centrado en ir forjando un nuevo consenso internacional para conseguir mejorar el presente y salvaguardar el futuro... (Naciones Unidas, 2024b).

Otra variante que alimenta la erosión genética es el cambio climático. El rápido cambio climático provoca variaciones ambientales importantes en los agroecosistemas. De forma que muchas variedades tradicionales, a pesar de ser biodiversas, no van a ser capaces de adaptarse a las nuevas condiciones y

pueden quedar excluidas por el propio proceso. En algunos casos podrían mantenerse por migración donde se den las condiciones adecuadas, pero se podría perder una parte importante de la diversidad durante el proceso. Cabe pensar, que la situación de las especies silvestres puede ser más llevadera por haber sufrido episodios de cambio climático anteriormente, adaptándose a los mismos mediante variación en las frecuencias alélicas y/o migración, pero la reducción y fragmentación de los hábitats junto con la actividad del ser humano puede dificultar o impedir dicha migración favoreciendo la extinción parcial o completa de diferentes especies (Bellon y van Etten, 2014; Ruiz de Galarreta et al., 2018). El cambio climático puede tener implicaciones importantes en la erosión genética de los cultivos y sus especies silvestres relacionadas, por lo que es necesario el desarrollo de estrategias para evitar la erosión genética de los mismos. Una de las iniciativas globales para asegurar la conservación de los recursos fitogenéticos es la “Boveda Global de Semillas de Svalbard” situada en el Círculo Polar Ártico, en la isla de Spitsbergen (Noruega), en el permafrost bajo una montaña para mantener temperatura en caso de avería de cámaras de conservación o problemas con el suministro de electricidad, y a 130 m.s.n.m, para evitar pérdidas en caso de inundación pensando en los peores casos de deshielo como consecuencia del cambio climático (Ford-Lloyd et al., 2014; Fowler, 2016; Ruiz de Galarreta et al., 2018). Es de vital importancia que la variabilidad genética necesaria para adaptar la agricultura a futuros cambios, conservada actualmente en los bancos de germoplasma, no se pierda por negligencia del presente. El cambio climático va a suponer algunos cambios en el uso de los bancos de germoplasma. La aceleración de este cambio supone un esfuerzo para poder atender la demanda de los materiales conservados, ampliando las colecciones tanto de los principales cultivos (con materiales aun no recolectados) como los cultivos minoritarios e infrautilizados y especies silvestres emparentadas, de suma importancia para una adaptación a condiciones extremas de cultivo. Hay que tener en cuenta que para poder responder con rapidez y con el material apropiado, cuyo potencial sea capaz de adaptarse a determinados estreses bióticos y abióticos, también será necesario optimizar la información disponible del germoplasma conservado para facilitar su uso (Díez et al., 2018). Aunque hay un consenso amplio en que el sistema de conservación en bancos de germoplasma *ex situ* es el más eficaz y rentable a gran escala, y a pesar de que desde los años 90 los organismos internacionales ya avisaban sobre los problemas a los que se enfrentaba este sistema, más de 30 años después los problemas parece que son los mismos, falta de financiación,

instalaciones y personal para conservar y gestionar todas las colecciones de los bancos de germoplasma, a excepción de los convenios y esfuerzos que llevan a cabo los organismos internacionales en este sentido (Fu, 2017; Díez et al., 2018).

1.4. Mejora y cambio climático

El uso de especies silvestres como recurso genético es tan antiguo como la especie humana, pero el uso de los genes es un fenómeno del siglo XX. El ser humano lleva mucho tiempo aprovechando la variación genética para seleccionar plantas o animales con las características que prefiere, semillas más grandes, gallinas que ponen más huevos o vacas que dan más leche, pero los genes no se utilizaron conscientemente hasta que supimos que existían. El uso de los recursos genéticos en la agricultura ha sido una aplicación de gran alcance. Aproximadamente entre 1930 y 1975 el rendimiento de trigo en EE.UU aumentó un 115%, el arroz un 117%, el maíz un 320%, la caña de azúcar un 141%, el cacahuete un 295%, la soja un 112%, el del algodón un 188% y el de la patata un 311%. Sobre el 50% de estos incrementos puede atribuirse a la contribución de los recursos genéticos (Prescott-Allen y Prescott-Allen, 1988). Es probable que los intercambios planificados de información genética con el germoplasma silvestre (de tomate) no se iniciaran hasta la década de 1940. Por entonces, el famoso genetista y fitomejorador Charlie Rick (Universidad de California, Davis) observó que los cruces entre especies silvestres y cultivadas generaban una gran variedad de variaciones genéticas novedosas en la descendencia. Desde entonces, los cruces interespecíficos han dado lugar a un gran aprovechamiento de los atributos favorables ocultos en las especies exóticas de tomate en el siglo XX (Bai y Lindhout, 2007). Como se ha mencionado anteriormente, la diversidad genética de las variedades tradicionales fue la base de la agricultura y la alimentación hasta casi la mitad del siglo XX. Estas variedades presentan gran susceptibilidad a la incidencia de enfermedades. El sesgo de los genes implicados en la respuesta defensiva, se asocia a la domesticación y la mejora. No está claro por qué estos genes pueden haberse perdido de forma desproporcionada, aunque podría ser por una pérdida aleatoria causada por la ausencia de selección positiva (la frecuencia del alelo aumenta en la población) para su retención o por la propia aptitud de los genes por la falta de capacidad de estos para recombinar y transmitirse a la descendencia (selección negativa) (Gao et al., 2019). Aunque se han logrado éxitos notables en la transferencia de genes de resistencia a enfermedades al

tomate cultivado, uno de los primeros ejemplos fue la resistencia de *Cladosporium fulvum* a partir de *S. pimpinellifolium* en 1934 (Walter, 1967; Bai y Lindhout, 2007). En la década de 1940 el gen de resistencia a nematodos *Mi* se introgressó en el tomate cultivado de la especie silvestre *S. peruvianum*, situado en el cromosoma 6 (Messeguer et al., 1991). El locus *I2*, localizado en el cromosoma 11, que confiere resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 2 fue introgressado de *S. pimpinellifolium* (Sarfatti et al., 1989). Un gen dominante, *Lv*, introgressado de *S. chilense*, situado cerca del centrómero del cromosoma 12, confiere resistencia a *Leveillula taurica* (Chunwongse et al., 1997). Los genes *Tm-1* (*S. habrochaites*, cromosoma 2), *Tm-2* y *Tm-2²* (*S. peruvianum*, cromosoma 9) confieren resistencia a ToMV (Tomato mosaic virus) (Hall, 1980). El gen *Sw-5* ofrece resistencia contra TSWV (Tomato spotted wilt virus) y se introdujo de *S. peruvianum*, situado en el cromosoma 9 (Brommonschenkel y Tanksley, 1997). El descubrimiento y uso de nuevos genes de resistencia de origen silvestre ha aumentado de manera constante, a un ritmo de aproximadamente una por año desde 1982, derivándose más de cuarenta genes de resistencia de las especies silvestres de tomate (Rick y Chetelat, 1995), siendo prácticamente todos los genes de resistencia a enfermedades que se encuentran actualmente en cultivares comerciales obtenidos a partir de recursos genéticos silvestres (Hajjar y Hodgkin, 2007).

La mayoría de los mejoradores se centran en el rendimiento, la resistencia a las enfermedades y la firmeza, que son esenciales para el transporte, el almacenamiento a largo plazo y el aspecto externo, más que en la calidad del sabor. El fenotipado del sabor es caro puesto que está sujeto a variaciones ambientales, por lo que está fuera del alcance de la mayoría de los programas de mejora (Tieman et al., 2017). Hace más de tres décadas que en los países occidentales se constata una insatisfacción por la calidad del tomate fresco. Es hacia la mitad de la década de los años 90 aproximadamente cuando el mercado empieza a ser cada vez más exigente al respecto y demanda cualidades organolépticas como el sabor o las vitaminas (Nuez, 1995). El sabor de cualquier alimento es la suma de las interacciones entre el gusto y el olfato. En el caso del tomate, los azúcares y los ácidos activan los receptores gustativos, mientras que un conjunto de volátiles activan los receptores olfativos. Los volátiles asociados al sabor están presentes en concentraciones de picomolares a nanomolares en las frutas y son extremadamente difíciles de cuantificar. Por lo tanto, estas sustancias químicas se han ignorado en gran medida y el énfasis en los rasgos de producción ha conducido inadvertidamente a una disminución de

la calidad del sabor. Las variedades tradicionales suelen conservar más las propiedades funcionales a diferencia de las variedades modernas (Tieman et al., 2017), seleccionadas por su manejo, uniformidad, tamaño, rendimiento o resistencia a enfermedades. Una mejora de la calidad sería derivar nuevos cultivares a partir de líneas mejoradas o cultivares tradicionales (Nuez, 1995). La recuperación de estos compuestos bioactivos pasa por la obtención de cultivares que no presenten muchas dificultades en su manejo, como, por ejemplo, variedades tradicionales con resistencia a los principales virus que afectan al cultivo del tomate y que mantengan las características propias de dichas variedades autóctonas (Cabrera et al., 2023). En 2009, cuando la calidad sensorial era uno de los objetivos de casi todos los programas de mejora de tomate, Alonso et al. (2009a) comparando el comportamiento poscosecha de una línea de mejora de tomate Muchamiel (con tres genes de resistencia a virus introgresados, ToMV, TYLCV y TSWV) con la variedad tradicional Muchamiel, indicaron que la calidad sensorial se había recuperado en el proceso de retrocruzamiento, lo que apoya la idea de que la mejora genética para la resistencia a enfermedades en el tomate podría lograrse sin reducir la calidad sensorial y la complejidad del aroma de las frutas. Entre otras, muchas son las investigaciones relacionadas con el sabor y el aroma del tomate: Ruiz et al., 2005, Tieman et al., 2006a, Tieman et al., 2006b, Alonso et al., 2009b, Granell y Rambla, 2013, Wang y Seymour, 2017, Klee y Tieman, 2018, Distefano et al., 2022.

En la actualidad, los objetivos fundamentales de un programa de mejora se pueden agrupar en cuatro grandes bloques: rendimiento, calidad, adaptación y resistencia a estreses. Los efectos del cambio climático someterán a las plantas a un determinado estrés abiótico que será el mayor factor limitante de la productividad, por lo que un programa de mejora para adaptación implica una búsqueda de resistencia a factores abióticos. Esto supone cierto grado de complejidad a la hora de definir los objetivos y caracteres a seleccionar, resulta más difícil al ser caracteres controlados por aun alto número de genes con efecto cuantitativo. Tolerancia a la sequía, resistencia a altas temperaturas, tolerancia a la salinidad, tolerancia a nuevos patógenos y resiliencia son los principales estreses asociados al cambio climático (Ruiz de Galarreta et al., 2018), entendiendo resiliencia como cierto grado de robustez de los cultivos, siendo capaces de mantener sus características productivas frente a ciertas perturbaciones o condiciones de incertidumbre. Para definir los métodos a utilizar en programas de mejora frente al cambio climático hay que tener en

cuenta que existen caracteres implicados muy complejos, relacionados con la tolerancia a estreses abióticos, y otros más simples, como a resistencias frente a plagas y enfermedades. No obstante, el término adaptación incluye parámetros como vigor temprano, maduración adecuada, respuesta a niveles de fertilización, resistencia a altas temperaturas y a sequía o tolerancia al frío (Ruiz de Galarreta et al., 2018). Puesto que cuando no se encuentran fuentes de variación dentro de la especie cultivada se debe recurrir a especies silvestres o formas semidomesticadas (Hajjar y Hodgkin, 2007), éstas presentan caracteres desfavorables que requieren de varias generaciones para su eliminación junto con el fenómeno del arrastre de ligamiento o *linkage drag*, pudiendo ser difícil la eliminación de genes desfavorables ligados al gen o región génica de interés de la especie silvestre, como en el caso del gen *Ty-1*, que confiere resistencia parcial al TYLCV (Verlaan et al., 2011). Una propuesta para facilitar la incorporación de la diversidad de las especies silvestres, dirigida fundamentalmente a adaptación de los cultivos frente al cambio climático, es la denominada introgresión (Prohens et al., 2017). La introgresión se ha definido como *“el desarrollo sistemático a escala masiva de materiales y poblaciones portadores de introgresiones de fragmentos genómicos procedentes de especies relacionadas (principalmente silvestres) en un fondo genético de cultivos, de forma que se puedan desarrollar nuevas generaciones de cultivares con propiedades mejoradas”*. El objetivo de la introgresión es desarrollar materiales con fondo genético de la especie cultivada pero que en su conjunto contengan introgresiones de especies silvestres, de esta manera se puede acortar el tiempo de los programas de mejora para desarrollar nuevos cultivares respecto a caracteres complejos. En definitiva, el cambio climático supone un reto para obtener materiales que permitan aumentar la producción y calidad de los cultivos, lo que hace énfasis en la tolerancia a estreses abióticos y bióticos y en la erosión genética, tanto en las especies cultivadas como en las silvestres relacionadas (Prohens et al., 2017).

1.5. Virus del rizado amarillo del tomate, TYLCV

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es afectado por más de cien especies virales según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV); las principales se incluyen en los géneros *Begomovirus*, *Orthotospovirus*, *Tobamovirus*, *Potyvirus* y *Crinivirus* (Shahriari et al., 2023). La mayoría de los virus que infectan plantas (80-90%) tienen ARN monocatenario como componente genético, mientras que el resto de los virus fitopatógenos contienen ADN como genoma (Rojas, 2000).

La familia de virus *Geminiviridae* tiene un genoma de ADN, compuesto por una o dos pequeñas moléculas circulares monocatenarias (ADN-A y ADN-B), de aproximadamente 2,5 a 3,0 kb cada una. Con un tamaño total del genoma que oscila entre 2,5 y 5,0 kb, los geminivirus se encuentran entre los virus más pequeños con genomas que se replican independientemente y son de los únicos virus ADN con genoma dividido (Rojas, 2000). Basándose en el rango de hospedadores, el tipo de insecto vector, la organización del genoma y las relaciones filogenéticas, la familia *Geminiviridae* se divide en catorce géneros: *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Capulavirus*, *Citlodavirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Grablovirus*, *Maldovirus*, *Mastrevirus*, *Mulcrilevirus*, *Opunovirus*, *Topocuvirus*, *Turncurtovirus* y *Topilevirus*. Hay 520 especies en la familia *Geminiviridae*. Entre estas especies, 445 pertenecen al género *Begomovirus*, que es el mayor de toda la virosfera (Silva et al., 2023). Un grupo de virus dentro del género *Begomovirus* es responsable de la enfermedad del virus del rizado amarillo de la hoja del tomate (TYLCVD) (Picó et al., 1996). Los begomovirus poseen uno o dos genomas circulares de ADN monocatenario (ssADN), cada uno de unos 2,7-2,8 kb de tamaño. El TYLCV y la mayoría de los begomovirus similares al TYLCV (Tabla 3) tienen genomas monopartitos formados por una molécula de ssADN (Figura 17), excepto el virus Kanchanaburi del rizado amarillo del tomate (TYLCKaV) y el virus tailandés del rizado amarillo del tomate (TYLCTHV). Estos dos begomovirus son bipartitos, con un genoma que contiene dos moléculas de ssADN -ADN-A y ADN-B (Yan et al., 2021) (Tabla 3). TYLCV tiene un gran potencial de cambio debido a factores como la mutación y la recombinación genética, lo que permite una rápida adaptación del complejo TYLCV a las condiciones ambientales en constante cambio (Navas-Castillo et al., 2011; Yan et al., 2021). Se ha observado un alto grado de recombinación intra e interespecífica dentro del complejo TYLCV y entre begomovirus (Abhary et al., 2007; Yan et al., 2021). Por ejemplo, TYLCV-IL (cepa israelí) es el resultado de la recombinación entre TYLCV-Mld y el virus del rizado del tomate de Karnataka (ToLCKV), mientras que la cepa de Cerdeña (TYLCV-Sr) probablemente surgió de un ancestro del virus del mosaico de la yuca sudafricano (SACMV) por intercambio genético mediante recombinación. La coinfección de plantas de tomate con TYLCV-IL y TYLCV-Sr (renombradas TYLCV y TYLCSV respectivamente; Fauquet et al., 2000) condujo a la aparición de dos virus recombinantes asociados con TYLCD, TYLCMaV y TYLCAxV, que han adquirido una gama de hospedadores más amplia que cualquiera de los parentales. Además, ha surgido una nueva cepa del virus, TYLCV-IS76, debido

a un evento de recombinación entre TYLCV-IL y la cepa española de TYLCSV (TYLCSV-ES). TYLCV-IL [IT:Sic23:16] y TYLCV-IL-[IT:Sa IS141:16] se originaron a partir del intercambio genético de las cepas parentales TYLCV y TYLCSV (Yan et al., 2021).

Tabla 3. Especies de virus del complejo-TYLCV según la lista del Comité Internacional de Taxonomía de Virus de 2023. Código asignado: 2023.015P. Título abreviado: Rename 520 species (*Glepafuvirales: Geminiviridae*).

Species	Current species name	Virus name	Virus name abbreviation	Genome composition	GeneBank accession number
<i>Begomovirus solanumflavusaxarquiaense</i>	<i>Tomato yellow leaf curl Axarquia virus</i>	tomato yellow leaf curl Axarquia virus	TYLCAxV	ssDNA	NC_011024
<i>Begomovirus solanumflavuschinaense</i>	<i>Tomato yellow leaf curl China virus</i>	tomato yellow leaf curl China virus	TYLCCNV/HH	ssDNA	NC_004044
<i>Begomovirus solanumflavusguangdongense</i>	<i>Tomato yellow leaf curl Guangdong virus</i>	tomato yellow leaf curl Guangdong virus	TYLCGdV	ssDNA	NC_008374
<i>Begomovirus solanumflavusindonesiaense</i>	<i>Tomato yellow leaf curl Indonesia virus</i>	tomato yellow leaf curl Indonesia virus	TYLCIDV	ssDNA	NC_008267
<i>Begomovirus solanumflavuskanchanaburiense</i>	<i>Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus</i>	tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus	TYLCKaV	ssDNA	DNA-A: NC_005812; DNA-B: NC_005811
<i>Begomovirus solanumflavusmalacitanum</i>	<i>Tomato yellow leaf curl Malaga virus</i>	tomato yellow leaf curl Malaga virus	TYLCMaV	ssDNA	NC_004569
<i>Begomovirus solanumflavusmaliense</i>	<i>Tomato yellow leaf curl Mali virus</i>	tomato yellow leaf curl Mali virus	TYLCMLV	ssDNA	NC_027215
<i>Begomovirus solanumflavusardiniaense</i>	<i>Tomato yellow leaf curl Sardinia virus</i>	tomato yellow leaf curl Sardinia virus	TYLCSaV	ssDNA	NC_003828
<i>Begomovirus solanumflavushuangbaiense</i>	<i>Tomato yellow leaf curl Shuangbai virus</i>	tomato yellow leaf curl Shuangbai virus	TYLCShV	ssDNA	NC_029995
<i>Begomovirus solanumflavusthailandense</i>	<i>Tomato yellow leaf curl Thailand virus</i>	tomato yellow leaf curl Thailand virus	TYLCTHV/A	ssDNA	DNA-A: NC_000869; DNA-B: NC_000870
<i>Begomovirus solanumflavusvietnamense</i>	<i>Tomato yellow leaf curl Vietnam virus</i>	tomato yellow leaf curl Vietnam virus	TYLCVV	ssDNA	NC_009548
<i>Begomovirus coheni</i>	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	tomato yellow leaf curl virus	TYLCV	ssDNA	NC_004005
<i>Begomovirus</i>	<i>Tomato yellow leaf</i>	tomato yellow leaf	TYLCYnV	ssDNA	NC_021341



Figura 17. Organización del genoma del virus del rizado amarillo del tomate, TYLCV. El ADN monocatenario del virión consta de 2787 nt. Los marcos de lectura abiertos (ORFs) en el sentido viral y en el sentido complementario se designan V y C, respectivamente, separados por una región intergenética no codificante, IR. Los ORFs están representados por una flecha; los números indican el primer y el último nucleótido de cada ORF. V1 codifica la proteína de la capsida (CP), V2 una proteína de movimiento, C1 la proteína iniciadora de la replicación (Rep), C2 una proteína activadora transcripcional (TrAP), C3 una proteína potenciadora de la replicación (REn) y C4 un determinante de síntoma y movimiento. La repetición invertida conservada que flanquea la secuencia mononucleotídica conservada TAATATTAC se simboliza mediante un bucle de tallo; una punta de flecha indica la posición de corte de Rep en el bucle TAATATT/AC; A en el sitio de corte (/) es el nucleótido número uno, por definición (Czosnek, 2021). El Hemiptero hace referencia a la mosca blanca del tabaco, *Bemisia tabaci* Gennadius, vector transmisor del virus.



Figura 18. Detalle de los diferentes síntomas causados por la enfermedad del Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV. Fruncimiento de las hojas hacia arriba, aclaramiento de venas y síntomas de mosaico, ramificación excesiva, retraso del crecimiento y esterilización parcial o total.

La enfermedad se transmite a través de la mosca blanca del tabaco, *Bemisia tabaci* Gennadius (Figura 17), (Cohen y Harpaz, 1964). Los síntomas incluyen enanismo, fruncimiento de las hojas hacia arriba, aclaramiento de las venas y ramificación excesiva y retraso del crecimiento, todo ello asociado a síntomas de mosaico de leves a graves y esterilidad parcial o total de la planta (Figura 18) (Vasudeva y Sam Raj, 1948). El virus infecta a dicotiledóneas, principalmente solanáceas, y causa graves problemas en cultivos de tomate en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo, e incluso se sabe que ha acabado con cosechas enteras (Picó et al., 1996; Rojas et al., 2005; Wang et al., 2018; Kill et al., 2021). La primera evidencia de daños económicos en cultivos de hortalizas causados por *B. tabaci* se registró en 1931 en Israel. Una enfermedad similar al TYLCV se reportó por primera vez en Israel en 1939-1940 y se asoció con brotes de *B. tabaci* en los valles del Jordán y Bet She'an; toda la cosecha de tomate fue completamente destruida (Cohen y Antignus, 1994). En España, el virus se detectó por primera vez en 1992 en invernaderos de Murcia (Moriones et al.,

1993) y Almería (Reina et al., 1994), perteneciente a la especie de Cerdeña (tomato yellow leaf curl Sardinia virus, TYLCSV). Aislados de las especies TYLCV-Sr y TYLCV-IL (renombradas TYLCSV y TYLCV respectivamente; Fauquet et al., 2000) se encontraron implicados en epidemias de TYLCV en estas mismas regiones (Sánchez-Campos et al., 1999). Cinco años más tarde, tras episodios más graves, se detectó la presencia de la especie del virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV) en 1997 (Navas-Castillo et al., 1997). TYLCV-IL es probablemente la cepa más extendida a nivel mundial (Lefeuvre et al., 2010). La alta prevalencia de TYLCV-IL en el sur y sureste de España se debe al progresivo desplazamiento de TYLCV-Sr. Esto puede atribuirse a dos factores principales. En primer lugar, TYLCV-IL se transmite más eficientemente por biotipos locales de *B. tabaci*. En segundo lugar, la judía común, que sirve de cultivo puente entre los cultivos de tomate, actúa como huésped de TYLCV-IL pero no de TYLCV-Sr. Esto sugiere que la judía común sirve de reservorio de TYLCV-IL (Sánchez-Campos et al., 1999). En la actualidad, el TYLCV sigue dificultando el cultivo de variedades tanto comerciales como tradicionales. Dado que las medidas preventivas y de control contra las poblaciones de *Bemisia tabaci* no son totalmente eficaces, la resistencia genética es la mejor estrategia a largo plazo para controlar la enfermedad. De hecho, la resistencia genética se perfila como la mejor estrategia para controlar las enfermedades víricas debido a un mercado internacional cada vez más exigente y a un creciente énfasis en la sostenibilidad medioambiental (Cabrera et al., 2024).

1.6. Loci de resistencia a TYLCV

La introducción de alelos resistentes al TYLCV en tomates cultivados a partir de especies silvestres comenzó en 1974 (Pilowsky y Cohen, 1990) y fue completada con éxito por varios investigadores (Friedmann et al., 1998; Kalloo y Banerjee, 1990; Kasrawi et al., 1988; Laterrot, 1992; Scott et al., 1995; Vidavsky y Czosnek, 1998; Zamir et al., 1994; Hanson et al., 2000). Hasta la fecha, se han identificado seis loci que condicionan niveles variables de tolerancia al TYLCV (Tabla 4). Zamir et al. (1994) encontraron el *Ty-1* en el cromosoma seis de la accesión LA1969 de *S. chilense*. *Ty-2*, derivado de *S. habrochaites*, fue posteriormente mapeado en el cromosoma 11 (Hanson et al., 2000; Hanson et al., 2006). *Ty-3* se localizó en el cromosoma seis de las accesiones LA1932 y LA2779 de *S. chilense* (Ji et al., 2007a) cerca del locus *Ty-1*, lo que sugiere un vínculo genético entre *Ty-1* y *Ty-3* (Ji et al., 2007b). En 2013, Verlaan et al. cartografiaron con precisión *Ty-*

1 y *Ty-3*, concluyendo que la región asignada a *Ty-3* de aproximadamente 71 kb se solapaba con la región que contiene *Ty-1*. El gen *Ty-4* también fue mapeado en *S. chilense* accesión LA1932, pero en el cromosoma tres (Ji et al., 2009). Más tarde, en otro estudio diseñado para mapear los loci que controlan la resistencia a TYLCV en TY172, los investigadores identificaron un QTL recesivo llamado *Ty-5* cerca del marcador *SINAC1* en el cromosoma cuatro (Friedmann et al., 1998; Anbinder et al., 2009). El programa de mejora de tomate de la Universidad de Florida ha desarrollado numerosas líneas de mejora con resistencia a begomovirus derivadas de Tyking, un híbrido obtenido por Royal Sluis (Enkhuizen, Países Bajos). Los análisis asistidos por marcadores moleculares confirmaron que la resistencia al TYLCV ofrecida por Tyking no estaba controlada por los genes *Ty-1*, *Ty-2*, *Ty-3* y *Ty-4*, por lo que varias de estas líneas se analizaron con el marcador *Ty-5* CAPS, *SINAC1*. Los resultados mostraron que el alelo derivado de Tyking era recesivo, por lo que los autores propusieron cambiar el nombre del locus derivado de TY172 a *aty-5* para reflejar mejor la acción recesiva del gen. Es probable que la resistencia asociada a Tyking corresponda a la de TY172, aunque se necesitan más pruebas para demostrar el alelismo de los genes (Hutton et al., 2012). En 2015, Lapidot et al. delimitaron el locus *ty-5* en un solo gen que codifica el homólogo en tomate del gen *Pelota* (*Pelo*), implicado en la fase de reciclaje del ribosoma durante la síntesis de proteínas, ruta que controla la resistencia a los begomovirus mediante el factor de vigilancia de ARN mensajero Pelota. Se identificaron dos SNP en *Pelo*, uno en la región promotora proximal y otro en su secuencia codificante, siendo el control de la resistencia ejercido por el SNP (una transversión de T a G en el primer exón del gen) observado en la secuencia codificante. Mediante el análisis de una población F2 Fla.8638B X Fla.7987, Hutton y Scott (2014) confirmaron el efecto de un gen de tolerancia a begomovirus en el cromosoma diez, denominado *Ty-6*. *Ty-1* se utiliza en programas de mejora en todo el mundo, ya que confiere un alto nivel de tolerancia, aunque no muestra una resistencia completa y, en condiciones de infección intensa, la mayoría de los cultivares acaban expresando síntomas (Pérez de Castro, 2007). Con la piramidalización asistida por marcadores moleculares es posible obtener materiales vegetales que proporcionen una resistencia más eficaz y duradera en el tiempo, facilitando el manejo de variedades tradicionales y comerciales, tanto al aire libre como en invernadero (Cabrera et al., 2024). Utilizando una combinación de genes, esta estrategia proporciona mayores niveles de resistencia, con lo que el virus encuentra más barreras para superar esta resistencia e infectar la planta.

Algunos autores han demostrado el comportamiento de estos genes frente al TYLCV, tanto individualmente como en combinación (Pérez de Castro et al., 2008; Ozores-Hampton et al., 2013; Prasanna et al., 2014; Scott et al., 2015; Elbaz et al., 2016; Al-Shihi et al., 2018; Wang et al., 2018; Yan et al., 2018; Ren et al., 2022; Ahmed et al., 2023), pero a priori no se ha estudiado ninguna de las líneas que portan los genes *Ty-1* y *ty-5*. Es importante evaluar esta combinación *Ty-1/ty-5* para determinar la respuesta de estos genes con diferentes niveles de tolerancia. La introgresión del gen *Ty-1* produce un efecto negativo sobre los caracteres productivos y de calidad dependiendo de las condiciones de cultivo y del fondo genético (Rubio et al., 2016). Esto se debe a que la recombinación no se produce en un fragmento de aproximadamente 35,5 megabases debido a dos mutaciones cromosómicas producidas en el cromosoma 6 de la fuente de resistencia, *Solanum chilense* accesión LA1969. Por lo tanto, es difícil eliminar el genoma de la especie silvestre durante el retrocruzamiento (Verlan et al., 2011). La búsqueda de recombinantes es un método alternativo para eliminar parte del genoma de la especie silvestre por lo que se llevó a cabo otra línea de trabajo asociada a este estudio. Para la búsqueda de individuos recombinantes se diseñaron varios marcadores moleculares próximos al gen *Ty-1* con el fin de identificar individuos que contengan *Ty-1* y no contengan alguno de los marcadores diseñados. Esto se traduce en una sustitución de parte del genoma de *S. chilense*, disminuyendo el efecto negativo de la introgresión y ofreciendo resistencia. Todos los marcadores se basaron en SNPs del Tomato Infinium Array de Illumina y se ajustaron para su visualización con la técnica de fusión de alta resolución (Cabrera et al., 2022). Se han realizado estudios prometedores con las mismas líneas tradicionales de pera (UMH175 y UMH220), así como con otras del tipo varietal Muchamiel, aunque recombinantes (datos por publicar). Estas líneas portan los alelos *Ty-1* y *ty-5* pero han perdido parte del fragmento introgresado de la especie silvestre ligado a *Ty-1*. Se espera que, en futuros ensayos, estos tipos varietales tradicionales mantengan niveles aceptables de producción sin comprometer sus cualidades organolépticas y morfológicas distintivas.

Hasta donde llega nuestro conocimiento, los dos artículos que incluye la presente tesis doctoral son los primeros estudios que evalúan el comportamiento de líneas de mejora portadoras de estos dos genes, *Ty-1* y *ty-5*. En el primero se muestra el efecto de la introgresión genética (de estos dos genes) en líneas de mejora de tomate tradicional del tipo varietal De la pera, examinando su impacto en varios caracteres de rendimiento y calidad, así como

en la capacidad antioxidante de los frutos. En el segundo se realiza una inoculación del TYLCV en condiciones controladas para evaluar el comportamiento de líneas de mejora de tomate tradicional Muchamiel y De la pera portadoras de estos dos genes y comprobar su nivel de tolerancia al TYLCV.

Tabla 4. Loci de resistencia al TYLCV identificados en especies silvestres.

Gen	Accesión	Especies	Cromosoma	Referencia
<i>Ty-1</i>	LA1969	<i>S. chilense</i>	6	Zamir et al., 1994; Verlaan et al., 2013
<i>Ty-2</i>	B6013	<i>S. habrochaites</i>	11	Kaloo y Banerjee, 1990; Hanson et al., 2000; Hanson et al., 2006
<i>Ty-3</i>	LA1932, LA2779	<i>S. chilense</i>	6	Ji et al., 2007a; Ji et al., 2007b; Verlaan et al., 2013
<i>Ty-4</i>	LA1932	<i>S. chilense</i>	3	Ji et al., 2009
<i>ty-5</i>	TY172	<i>S. peruvianum</i>	4	Friedmann et al., 1998; Anbinder et al., 2009; Hutton et al., 2012; Lapidot et al., 2015
<i>Ty-6</i>	LA1938	<i>S. chilense</i>	10	Hutton y Scott, 2014

1.6.1. Efecto de la introgresión de la resistencia genética a virus

Varios trabajos publicados han puesto de manifiesto el efecto negativo de la introducción de genes de resistencia, debido a los propios genes y/o a la carga de ligamiento. Tanksley et al. (1998) observaron ligeras reducciones en el rendimiento y la calidad de tomate para procesado con resistencia a ToMV. Lewis et al. (2007) encontraron una reducción en el rendimiento y la calidad en las plantas de tabaco que contienen el gen *N* (proveniente de la especie silvestre *Nicotiana glutinosa* L.), que confiere resistencia al TMV. Brouwer y St Clair (2004) encontraron que el fragmento de cromosoma de la especie *S. hirsutum* que confiere resistencia a *Phytophthora infestans* contenía alelos perjudiciales en caracteres agronómicos importantes. Verlaan et al. (2011) demostraron que en gran parte del cromosoma 6 de *S. chilense* (donde se encuentra el gen *Ty-1*, que confiere resistencia a TYLCV) la recombinación con el tomate cultivado es muy baja, debido a dos reordenaciones cromosómicas ocurridas en *S. chilense*. Este hecho dificultaría la eliminación del cromosoma de la especie silvestre durante los retrocruzamientos. Para cuantificar el efecto de la introducción de los genes de resistencia a ToMV, TSWV y TYLCV en

caracteres productivos y de calidad en tomate Muchamiel y De la pera, en la EPSO-UMH se desarrollaron dos conjuntos de líneas cuasi-isogénicas (NIL) que contenían todas las combinaciones homocigotas para los tres genes de resistencia, que se evaluaron durante 3 años. Se encontró que la introducción de la resistencia genética a TYLCV producía un descenso en los principales caracteres productivos (producción, peso medio) que oscilaba entre el 10% y el 50%, en función de las condiciones de cultivo y del fondo genético. El efecto en los caracteres de calidad fue menor, obteniéndose sólo un ligero descenso en la acidez (Rubio et al., 2016). El efecto de la introducción de resistencia a ToMV y TSWV fue menor, encontrándose sólo en algunos de los ensayos.

1.6.2. Alternativas para reducir el efecto negativo de la introgresión del gen *Ty-1* en homocigosis

Para intentar superar este inconveniente existen varias alternativas. Una es obtener líneas sin resistencia a TYLCV. Estas líneas sin resistencia a TYLCV pueden ser interesantes para su cultivo en ausencia del virus, condiciones que se pueden conseguir en invernadero con un control adecuado, especialmente en el ciclo de primavera, en el que la incidencia de TYLCV es menor (García-Martínez et al., 2014; 2015; 2016). Otra opción es introducir el *Ty-1* en heterocigosis obteniendo híbridos F1, pero en este caso, los agricultores no pueden quedarse semilla de un año para otro, pues la segregación hace que no todas las plantas tengan resistencia. Esta estrategia se ha utilizado en el programa de mejora del CIAGRO-UMH, desarrollando los híbridos UMH1101xIF, UMH1200xBFT y UMH1200xCG, cruzando las líneas de mejora con resistencia en homocigosis a ToMV, TYLCV y TSWV con las variedades tradicionales Indische Fleish, Black from Tula y Costoluto Genovese. Estos híbridos fueron inscritos en el Registro de Variedades Protegidas y en el registro de Variedades Comerciales entre los años 2017 y 2019. Otra opción es eliminar parte de la carga de ligamiento que acompaña al *Ty-1*, buscando recombinantes. Hutton y Scott (2017) desarrollaron la línea de tomate cherry Fla. 7907C, que contiene solo 1 MB de la accesión de *S. chilense* LA1969 en el cromosoma 6, a partir del híbrido comercial Tygress, que contiene 30 MB del silvestre. Siguiendo esta estrategia, en el proyecto europeo “Traditional tomato varieties and cultural practices: a case for agricultural diversification with impact on food security and health of European population, TRADITOM”, coordinado por el Dr. Antonio Granell del IBMCP-UPV), uno de sus objetivos fue la obtención de individuos recombinantes con menor carga de ligamiento, manteniendo los genes *Ty-1* en el cromosoma 6 y el *Tm-2²* en el cromosoma 9. A

partir de materiales BC10S1 Muchamiel y BC8S1 De la pera del CIAGRO-UMH se obtuvieron y evaluaron recombinantes de estos tipos varietales para uno de los genes, pero no a los dos genes simultáneamente. Se encontró que las líneas recombinantes, con sólo 3 MB de *Solanum chilense* en el cromosoma 6, tienen un mejor comportamiento agronómico (producción, número de frutos y peso medio de los frutos) que las líneas no recombinantes, con 35 MB de *Solanum chilense*. En cambio, no se encontró un efecto tan claro para los recombinantes con menor cantidad de genoma de *Solanum peruvianum*. Otra de las opciones es introducir otros genes de resistencia que no tengan ese efecto negativo. En los últimos años se han descubierto y/o reevaluado distintas fuentes de resistencia a TYLCV (Pérez de Castro et al., 2013; Viquez-Zamora et al., 2014; Pereira-Carvalho et al., 2015; Caro et al., 2015; Wolters et al., 2015), que pueden emplearse para complementar, en algunos casos, o sustituir, en otros, al gen *Ty-1*. Entre ellas destaca el gen *ty-5*, encontrado en la variedad comercial Tyking, que ha demostrado que proporciona una resistencia útil frente a varios begomovirus mono y bipartitos, incluyendo TYLCV (Hutton et al., 2012). Dado que los genes *Ty* condicionan niveles variables de tolerancia, como se ha mencionado anteriormente, se necesitan materiales vegetales que proporcionen una resistencia más eficaz y duradera en el tiempo para facilitar el manejo de los cultivos. En consecuencia, en el programa de mejora genética de variedades del CIAGRO-UMH, finalizada la introgresión del gen *ty-5*, se decidió introducir el gen *Ty-2* con el objetivo de obtener líneas con los genes *Ty-1*, *ty-5* y *Ty-2* para aumentar la resistencia genética a TYLCV. En marzo de 2021 se realizaron los cruces de parentales entre las líneas UMH1200+*ty-5* y UMH1406+*ty-5* y las líneas H24 y CLN2116B (portadoras del gen *Ty-2*, y cedidas por el COMAV-UPV) para la obtención de la generación F1. A partir de aquí, continuamos cruzando por el parental recurrente hasta obtener el cuarto retrocruce BC4 durante el ciclo de cultivo de otoño-invierno de 2023-2024. Para poder realizar la selección asistida por marcadores moleculares, se realizó el diseño y la puesta a punto de marcadores (Cabrera et al., 2021) para su visualización e interpretación mediante la técnica HRM para así, poder seleccionar la descendencia heterocigota precozmente (toma de muestras en semillero en plantas con dos o tres hojas verdaderas) en cada generación de retrocruces.

OBJETIVOS



2. Objetivos

El objetivo general de la tesis doctoral es aumentar la resiliencia de dos variedades tradicionales de tomate, Muchamiel y De la pera, mediante la introgresión de genes de resistencia a virus, estudiando el efecto de la resistencia sobre variables de producción y calidad, y estudiando la eficacia de dicha resistencia en plantas indicadoras de la interacción entre el virus y la planta.

Anótese, que los caracteres desfavorables motivados por la introducción, requieren de varias generaciones para su eliminación, además del arrastre de ligamiento o *linkage drag*, pudiendo ser difícil la eliminación de genes desfavorables ligados al gen o región génica de interés de la especie silvestre, como el caso del gen *Ty-1* (detallado en los puntos 1.6 y 1.6.1). Dicho lo anterior, uno de los objetivos de la tesis doctoral era obtener genotipos recombinantes a *Ty-1*, es decir, plantas en cuyo fondo genético se haya eliminado ese arrastre de ligamiento. Aunque se obtuvieron los genotipos recombinantes, no se consiguieron realizar los diferentes ensayos con estas plantas recombinantes por dificultades en el desarrollo de los cultivos para obtener la suficiente cantidad de semilla. En su lugar, los ensayos se realizaron con los genotipos objetivo, pero con plantas no recombinantes a *Ty-1*. Por tanto, la búsqueda de recombinantes se tratará como un subpunto (2.1) incluido en el objetivo 2 y se desarrollará en el punto 3.1.2.1. de obtención de genotipos recombinantes en el apartado de materiales y métodos, con el propósito de dar claridad y poder explicar esta parte de la tesis doctoral. A continuación se enumeran los objetivos de la tesis doctoral

1. Complementar la resistencia genética a TYLCV a partir de líneas con el gen *Ty-1* y continuar con el desarrollo de las mismas con el gen *ty-5*.
2. Obtención de nuevas líneas no recombinantes con las diferentes combinaciones de genotipos en homocigosis para los dos genes.
 - 2.1. Obtención de nuevas líneas recombinantes con las diferentes combinaciones de genotipos en homocigosis para los dos genes.
3. Estudio del efecto de la introgresión de los genes *Ty-1* y *ty-5* en caracteres productivos, de calidad y capacidad antioxidante de los frutos de tomate.
4. Evaluación de la resistencia de los genes *Ty-1* y *ty-5* en plantas infectadas con TYLCV.

MATERIALES Y MÉTODOS



3. Materiales y métodos

En 1998 se inició en la Universidad Miguel Hernández (CIAGRO-UMH) un programa de mejora genética para desarrollar variedades tradicionales de tomate, Muchamiel y De la Pera, con resistencia a los tres principales virus que afectan al cultivo del tomate (ToMV, TSWV y TYLCV). El objetivo era desarrollar líneas puras que pudieran ser utilizadas por los agricultores para obtener semilla a lo largo de cada ciclo de cultivo o servir como líneas parentales para el programa de mejora. En 2017 se inició la introgresión del alelo *ty-5* para complementar la resistencia *Ty-1* introducida previamente. A partir de dos líneas homocigotas resistentes para *Tm-2²* (ToMV), *Ty-1* (TYLCV) y *Sw-5* (TSWV), una Muchamiel (UMH1200) y otra De la pera (UMH1406), comienza la obtención de las nuevas líneas añadiendo el gen *ty-5* (TYLCV).

3.1. Metodología

3.1.1. Objetivo 1: complementar la resistencia genética a TYLCV a partir de líneas con el gen *Ty-1* y continuar con el desarrollo de las mismas con el gen *ty-5*

La introgresión del *ty-5* y el desarrollo de las nuevas líneas se realizaron mediante retrocruzamiento, hasta obtener el retrocruce (backcross, BC) de quinta generación (BC5), partiendo de semilla BC3. Para la selección de los genotipos dobles heterocigotos a *Ty-1* y *ty-5*, se realizó una selección precoz en semillero asistida por marcadores moleculares (SAM). Se utilizaron marcadores basados en SNPs resueltos mediante un análisis de Fusión de Alta Resolución (High Resolution Melting, HRM) basado en la detección de pequeñas diferencias en las curvas de Fusión (disociación) de la PCR, puestos a punto por Alonso et al. (2015). Las plantas se desarrollaron en cultivo sin suelo en sustrato de perlita, en un invernadero de policarbonato a dos aguas ubicado en la Escuela Politécnica Superior de Orihuela de la Universidad Miguel Hernández (EPSO-UMH). Las semillas BC4 y BC5 se obtuvieron durante el primer año, en el ciclo de cultivo de otoño-invierno (2019-2020) y en el ciclo de cultivo de primavera-verano (2020) respectivamente.

3.1.2. Objetivo 2: obtención de nuevas líneas no recombinantes con las diferentes combinaciones de genotipos en homocigosis para los dos genes

En el ciclo de cultivo otoño-invierno 2020-2021 se sembraron las poblaciones BC5 obtenidas en el objetivo 1. A través de SAM y HRM se seleccionan en semillero los genotipos dobles heterocigotos para *Ty-1* y *ty-5*, y se cultivaron en

el mismo invernadero y en las mismas condiciones para que se produzca la autofecundación y obtener nueve genotipos BC5S1: RRSS, RRSr, RRrr, RsSS, RsSr, Rsrr, ssSS, ssSr y ssrr. En el siguiente ciclo de cultivo (primavera-verano 2021) se pasaron marcadores y se seleccionaron los genotipos homocigotos para los dos genes (RRSS, RRrr, ssSS y ssrr), dando lugar a cuatro genotipos con todas las combinaciones en homocigosis para *Ty-1* y *ty-5*. Estos genotipos se autofecundaron, y se obtuvo la suficiente cantidad de semilla BC5S2 para poder realizar el primer ensayo de campo en el ciclo de primavera-verano 2022. En el año 2023 se repitió el ensayo en las mismas condiciones. Las líneas Muchamiel con las mejores características para su cultivo y multiplicación fueron los BC5S1 62 y 136. Las líneas De la pera Fueron los BC5S1 175 y 220.

3.1.2.1. Obtención de nuevas líneas recombinantes con las diferentes combinaciones de genotipos en homocigosis para los dos genes

Se encontraron individuos que conteniendo el gen *Ty-1* tuvieron una menor carga de ligamiento, al haber perdido por recombinación durante la meiosis parte del fragmento del cromosoma 6 de *S. chilense*, donde se encuentra dicho gen, tanto para el tipo Muchamiel como para el tipo De la pera. Se utilizó como material de partida las poblaciones BC5 obtenidas en el objetivo 1. Utilizando marcadores SNP con la técnica HRM se seleccionaron los individuos BC5 con genotipo RsSr (*Ty-1* y *ty5* respectivamente), que se cultivaron y autofecundaron para que en la meiosis se obtuvieran recombinantes con el *Ty-1*, que habían perdido gran parte de ese fragmento arrastrado del cromosoma 6 de *S. chilense*. Estos individuos BC5S1 recombinantes se encontraron y se acotó la zona donde se produjo la recombinación estudiando 8 SNPs distribuidos en la región del cromosoma que contiene el gen *Ty-1*, mediante la técnica de genotipado HRM. Se estudiaron 778 plantas Muchamiel (BC5S1-62) y 767 De la pera (BC5S1-220). Los individuos recombinantes (y no recombinantes, utilizados finalmente en este estudio y previstos para estimar el efecto de la pérdida por recombinación) que contienen los alelos de resistencia se cultivaron y autofecundaron, para fijar en homocigosis los cromosomas recombinantes, obteniendo así familias BC5S2. En las familias BC5S2, utilizando marcadores HRM, se seleccionaron individuos con los genotipos RrecRrec-rr (recombinante homocigoto resistente *Ty-1*/homocigoto resistente *ty-5*), RrecRrec-SS (recombinante homocigoto resistente *Ty-1*/susceptible *ty-5*), RR-rr (homocigoto resistente *Ty-1*/homocigoto resistente *ty-5*), RR-SS (homocigoto resistente *Ty-1*/susceptible *ty-5*) y ss-rr (susceptible *Ty-1*/homocigoto resistente *ty-5*), tanto para el tipo Muchamiel como para el De la

pera, que se cultivaron y autofecundaron, y formaron las familias BC5S3-rec. Se obtuvo semilla suficiente para futuros ensayos de cada familia BC5S3-rec.

3.1.2.2. Diseño de marcadores moleculares ligados al gen *Ty-1* para la búsqueda de individuos recombinantes que hayan perdido parte de la carga de ligamiento asociada al gen *Ty-1*

Para buscar individuos recombinantes se han diseñado varios marcadores moleculares cercanos al gen *Ty-1* para poder identificar los individuos que contengan el *Ty-1* y no contengan algunos de los marcadores diseñados, lo que se traduce en una eliminación de parte del genoma de *S. chilense*, disminuyendo el efecto negativo de la introgresión y ofreciendo la resistencia (Figura 20). Todos los marcadores se basan en SNPs del Tomato Infinium Array de Illumina y se han puesto a punto para visualizarlos con la técnica High Resolution Melting. Se seleccionaron 6 SNPs, situados a 1, 3, 9, 12,5, 18 y 22,5 MB del gen *Ty-1*, y se diseñaron 2 parejas de cebadores para cada uno de ellos (Figura 19). Se realizó un primer cribado con uno de los dos marcadores más alejados (C11), para identificar todos los individuos recombinantes. Posteriormente, con el resto de marcadores (incluidos los marcadores C3 y C4 puestos a punto anteriormente por Alonso et al., 2015) se acotó la zona donde se produjo la recombinación, lo que permite saber el tamaño de los fragmentos que habían perdido cada uno de los individuos recombinantes (Figura 20). Se estudiaron 778 plantas Muchamiel y 767 De la pera para finalmente obtener dos plantas recombinantes Muchamiel (Figura 21) y tres De la pera (Figura 22). Se han obtenido individuos homocigotos resistentes no recombinantes, heterocigotos recombinantes y homocigotos recombinantes para la realización de varios ensayos próximamente, y comprobar el efecto de la pérdida de los fragmentos de *S. chilense*.

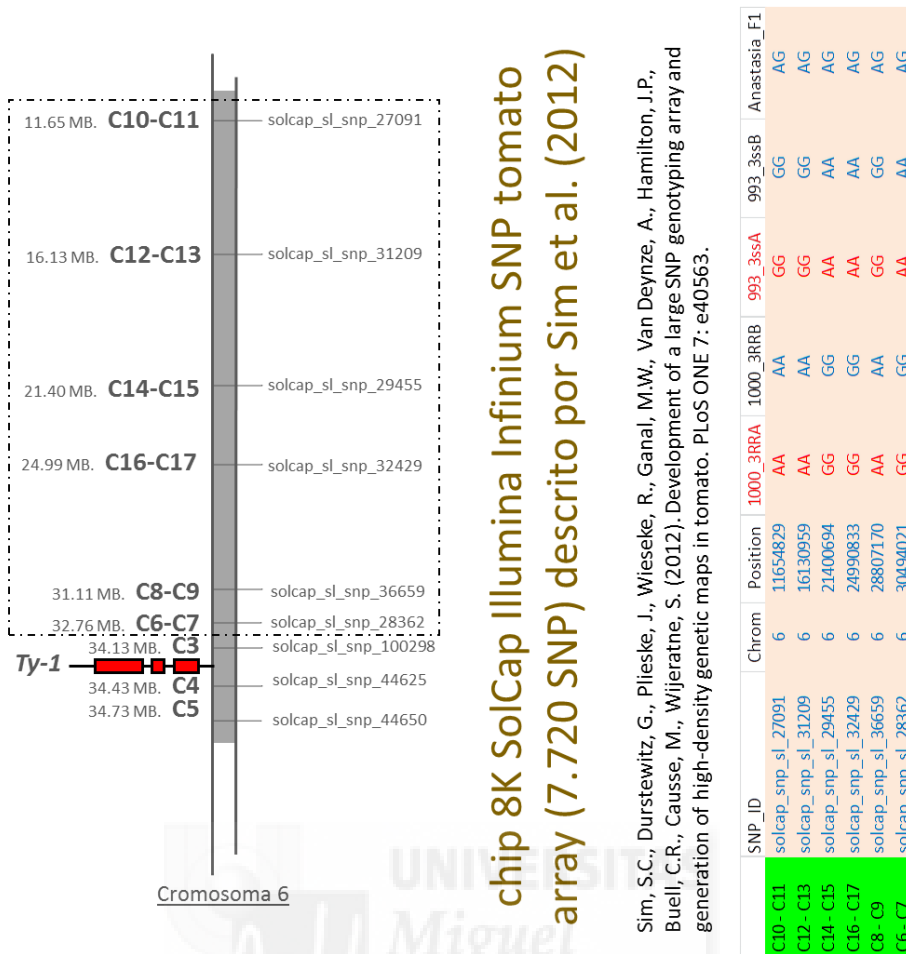


Figura 19. Marcadores diseñados para identificar los individuos recombinantes (C6 a C17) junto a la identificación del SNP de cada pareja de cebadores.

Plantas recombinantes	C11 (11.65 MB)	C12-C13 (16.13 MB)	C14-C15 (21.40 MB)	C16-C17 (21.40 MB)	C6 (32.76 MB)	C3 (34.13 MB)	<i>Ty-1</i>	C4 (34.43 MB)
974	ss	ss	ss	ss	Rs	Rs		Rs
1295	ss	ss	ss	ss	Rs	Rs		Rs
1611	Rs	Rs	Rs	Rs	RR	RR		RR
1774	Rs	Rs	Rs	Rs	Rs	RR		RR
1836	Rs	Rs	Rs	Rs	Rs	RR		RR

Figura 20. Recombinación de las plantas recombinantes obtenidas. La línea acota la zona donde se produjo la eliminación de parte del fragmento de carga ligamiento arrastrado de *S. chilense*. Las plantas 974 y 1295 corresponden al tipo varietal Muchamiel (BC5S1-62) y las plantas 1611, 2774 y 1836 corresponden al tipo varietal De la pera (BC5S1-220).

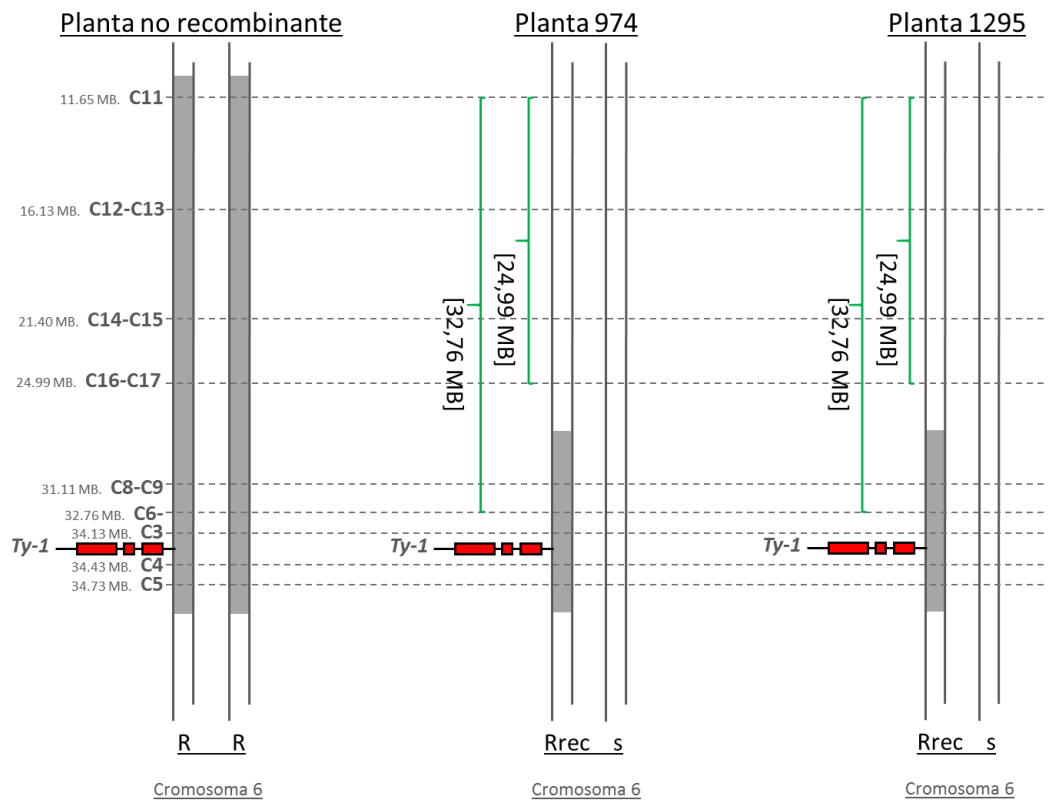


Figura 21. Detalle de la recombinación en las plantas Muchamiel.

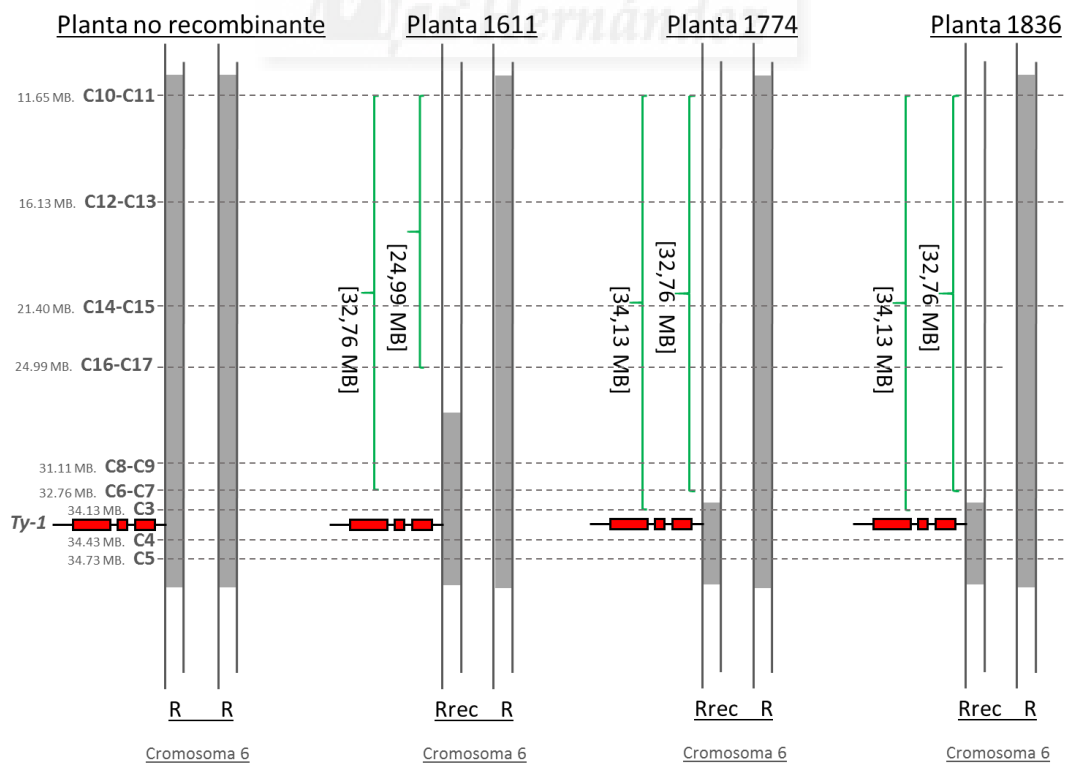


Figura 22. Detalle de la recombinación en las plantas De la pera.

3.1.3. Objetivo 3: estudio del efecto de la introgresión de los genes *Ty-1* y *ty-5* en caracteres productivos, de calidad y capacidad antioxidante de los frutos de tomate

Se llevaron a cabo dos ensayos de campo, uno el ciclo de cultivo de primavera-verano del año 2022 y su repetición en el año 2023 bajo las mismas condiciones. Las plantas se cultivaron en suelo en un invernadero de malla en la EPSO-UMH en condiciones de manejo y fertilización típicas de la zona, aportando fertilizantes inorgánicos en el agua de riego. Aunque se estudiaron los dos tipos varietales en los dos años, el desarrollo de las plantas Muchamiel no fue el adecuado, y en consecuencia, los datos no han sido publicados ni tratados en la tesis doctoral. El estudio de las 2 familias BC5S2-175 y BC5S2-220 (tipo Varietal De la pera) permitió estimar el efecto de la introducción de los genes *Ty-1* y *ty-5*, individual y conjuntamente (en el caso de haber podido utilizar los materiales recombinantes, también se hubiera estimado el efecto de la pérdida de carga de ligamiento por recombinación asociada al gen *Ty-1*). Se estudiaron caracteres productivos (producción y peso medio), calidad organoléptica (contenido de sólidos solubles totales y acidez total), y capacidad antioxidante de los frutos de tomate. La producción fue expresada como el sumatorio de todos los frutos recogidos por planta (k/pl) utilizando una balanza. El peso medio de los frutos se estimó por el cociente entre la producción y el número de frutos (kg/fruto). El contenido de sólidos solubles totales y acidez total se expresó en °Brix y % ácido cítrico/100 g de tejido fresco respectivamente. La actividad antioxidante en mmol Trolox/kg de materia seca y los fenoles totales en miligramos de equivalente de ácido gálico por 100 g de muestra de materia seca (mg de ácido gálico eq/100 g de materia seca). Los análisis de varianza se realizaron según el modelo lineal generalizado unifactorial, con los genotipos como factor. Se utilizó el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher para la discriminación de medias con un nivel de confianza del 95%. Statgraphics y Excel fueron los programas utilizados para la interpretación de resultados.

3.1.4. Objetivo 4: evaluación de la resistencia de los genes *Ty-1* y *ty-5* en plantas infectadas con TYLCV

Se llevaron a cabo tres estudios de incidencia de la enfermedad durante los años 2021, 2022 y 2023, incluyendo en el último un análisis de cuantificación de carga viral mediante qPCR. Se realizaron bajo condiciones experimentales, y se incluyeron los genotipos BC5S2 de los dos tipos varietales (Muchamiel y De la pera) obtenidos en el objetivo 2, dos líneas de mejora con solo *Ty-1* o *ty-5* y un cultivar tradicional (susceptible) como controles. Las plantas se cultivaron en macetas en una cámara de crecimiento con 25 °C de temperatura, 60 a 65% y 95 a 99% de humedad relativa (día/noche), 34 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ de irradiancia y fotoperiodo

16/8 (luz/oscuridad). La inoculación se llevó a cabo mediante el método de agroinoculación (Kheyr-Pour et al., 1994). La evaluación de síntomas se basó en la escala propuesta por Friedmann et al. (1998) (Figura 23), en la que 0 = ningún síntoma; 1 = síntomas muy leves, con amarilleamiento de los márgenes de los folíolos en las hojas apicales; 2 = síntomas leves, con cierto amarilleamiento y rizado menor de los extremos de los folíolos; 3 = una amplia gama de amarilleamiento, rizado y ahuecamiento de las hojas, con cierta reducción del tamaño, aunque las plantas siguen creciendo; y 4 = síntomas graves, con un atrofiamiento y amarilleamiento muy graves de las plantas y ahuecamiento y rizado pronunciados, y las plantas dejan de crecer. La acumulación de carga viral se cuantificó mediante qPCR para complementar y apoyar los resultados de los ensayos de incidencia de la enfermedad.

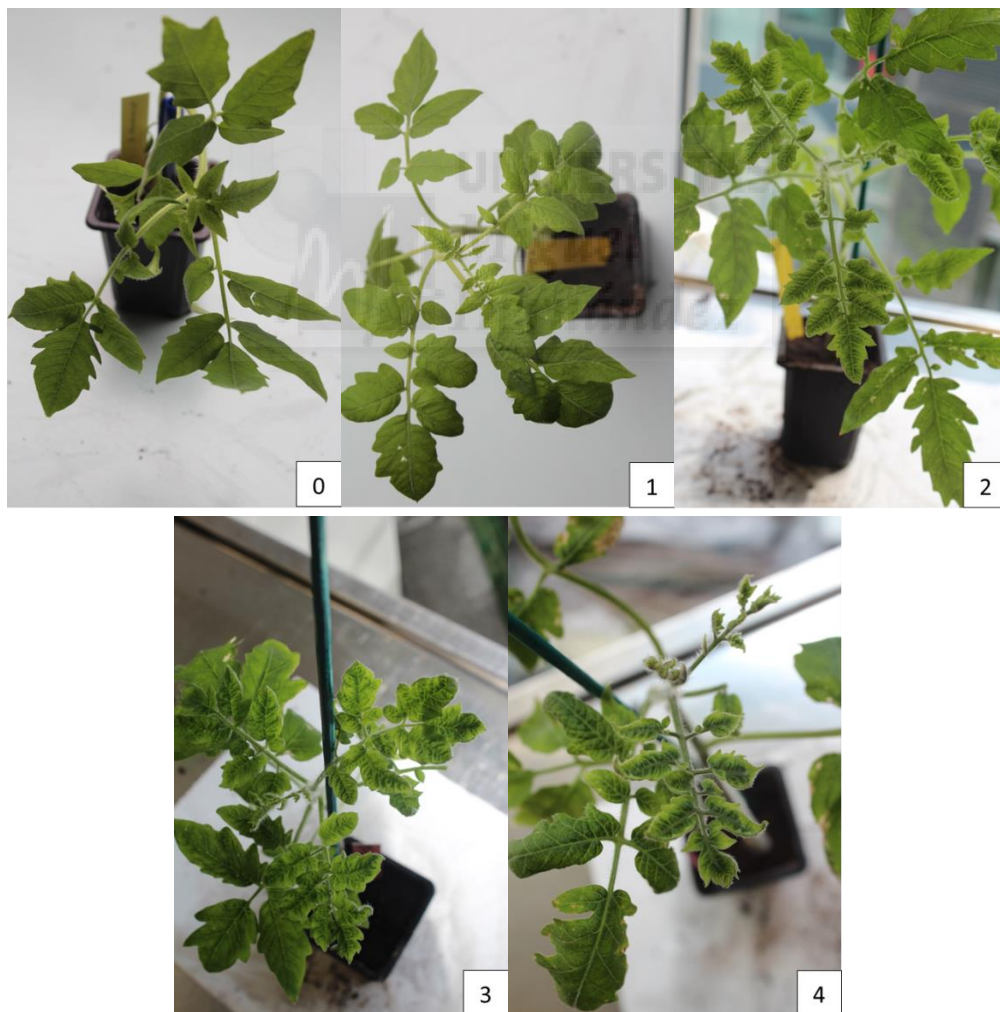


Figura 23. Índice de gravedad de la enfermedad: 0 = ausencia de síntomas; 1 = síntomas muy leves, con amarilleamiento de los márgenes de los folíolos en las hojas apicales; 2 = síntomas leves, con cierto amarilleamiento y rizado menor de los extremos de los folíolos; 3 = una amplia gama de amarilleamiento, rizado y ahuecamiento de las hojas, con cierta reducción del tamaño, aunque las plantas siguen creciendo; y 4 = síntomas graves, con un atrofiamiento y amarilleamiento muy graves de las plantas y ahuecamiento y rizado pronunciados, y las plantas dejan de crecer.

gama de amarilleamiento, rizado y ahucamiento de las hojas, con cierta reducción de tamaño, aunque las plantas siguen creciendo; y 4 = síntomas graves, con atrofia y amarilleamiento muy severos de la planta y ahucamiento y rizado pronunciados, y las plantas dejan de crecer.

A continuación se muestra un cronograma con los objetivos y el periodo en el que se han desarrollado (Figura 24).

	Año 1		Año 2		Año 3		Año 4		Año 5
	otoño '19	prim. '20	otoño '20	prim. '21	otoño '21	prim. '22	otoño '22	prim. '23	otoño '23
Objetivo 1									
Obtención del BC4	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Obtención del BC5	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Objetivo 2									
Obtención del BC5S1 (genotipos en homocigosis)	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Obtención del BC5S2 (multiplicación de los genotipos)	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Obtención del BC5S1 (generación de recombinantes)	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Obtención del BC5S2 (identificación de recombinantes)	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Obtención del BC5S3 (multiplicación de recombinantes)	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Objetivo 3									
Cultivo y evaluación agronómica	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Análisis de calidad y c. antioxidante bis cultivo y evaluación agronómica bis análisis de calidad y c. antioxidante	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Objetivo 4									
Evaluación de la resistencia a TYLCV (inoculación de genotipos)	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Figura 24. Cronograma del plan de trabajo de la tesis doctoral. Se resumen cada uno de los objetivos de acuerdo al ciclo de cultivo en el que se lleva a cabo cada uno de ellos. El ciclo de otoño hace referencia a los meses de septiembre a febrero. El ciclo de primavera hace referencia a los meses de marzo a agosto.

3.1.5. Marcadores y protocolos de actuación HRM

En los procesos de qPCR y *melting* se utilizó el termociclador en tiempo real LightCycler 480 de Roche, con placas de 96 pocillos. Las condiciones del termociclador para ADN genómico y el contenido de las reacciones para el análisis HRM, se muestra en las Tablas 5 y 6. La secuencia de los cebadores asociada a cada uno de los genes se muestra en la Tabla 7.

Tabla 5. Protocolo y contenido de las reacciones HRM para los marcadores asociados a *Ty-1* (de C3 a C17) y a *Ty-2* (Ty2).

Etapa	Temperatura	Tiempo	Repetir	Componente	Volumen (10 μ L rxn)	Concentración final
Desnaturalización	95 °C	10'	1	Master mix	5	-
Amplificación	95 °C	15"	45	MgCl ₂ (25 mM)	1.2	3 mM
	60 °C	20"		Forware (10 mM)	0.2	0,2 mM
	72 °C	25"		Reverse (10 mM)	0.2	0,2 mM
<i>Melting</i>	72 °C	2'	1	ADN molde 40-60 (ng/ μ L)	0.5	20-30 ng/ μ L
	95 °C	1'	1	H ₂ O libre de nucleasas (μ L)	2.9	-
	40 °C	1'	1			
	60 °C hasta 95 °C	0,02 °C/s	1			
Enfriamiento	40 °C	1'	1			

Tabla 6. Protocolo y contenido de las reacciones HRM para el marcador asociado a *ty-5* (ty5).

Etapa	Temperatura	Tiempo	Repetir	Componente	Volumen (10 μ L rxn)	Concentración final
Desnaturalización	95 °C	10'	1	Master mix	5	-
Amplificación	95 °C	15"	45	MgCl ₂ (25 mM)	1.4	3,5 mM
	58 °C	20"		Forware (10 mM)	0.2	0,2 mM
	72 °C	25"		Reverse (10 mM)	0.2	0,2 mM
<i>Melting</i>	72 °C	2'	1	ADN molde 40-60 (ng/ μ L)	0.5	20-30 ng/ μ L
	95 °C	1'	1	H ₂ O libre de nucleasas (μ L)	2.7	-
	40 °C	1'	1			
	60 °C hasta 95 °C	0,02 °C/s	1			
Enfriamiento	40 °C	1'	1			

Tabla 7. Características de los marcadores HRM asociados a *Ty-1* (de C3 a C17), *ty-5* y *Ty-2*.

Marcador	Secuencia de los cebadores (5'-3')	Tm °C	AC	AC-3'	Longitud del Producto (pb)	% GC
C3 ^a	F: GAATTGGAGATTCTGGACCTG (21 pb)	56,02	5	3	175	47,62
	R: TTGTCTGATAAGCTGCATTAGTGT (24 pb)	58,51	5	2		37,50
C4 ^a	F: GCTATCATACGATCAGAGCATCA (23 pb)	58,01	6	1	101	43,48
	R: GCATCAGAAACTTCATTTGATTG (23 pb)	55,14	4	2		34,79
C5	F: ACTTTTATGACAAGGCCAGCTT (22 pb)	58,50	4	2	100	40,91
	R: TCAAGGGTAGGTACAAGTGTAGGA (24 pb)	60,20	6	0		45,83
C6 ^{abe}	F: ACAGTGACAAAGTTGTTCTAGGT (23 Ppb)	57,90	6	2	70	39,13
	R: TGACTCATTGGTTCACCTAACCC (23 PB)	60,24	5	2		47,83
C7 ^{ae}	F: ATTACAGTGACAAAGTTGTTCTAGG (25 pb)	57,27	6	2	75	36,00
	C: GCTGACTCATTGGTTCACCT (20 pb)	57,81	5	2		50,00
C8 ^{ae}	F: TGGGGTAATGCTGAGAATCCAC (22 pb)	60,09	5	3	84	50,00
	R: TCGAGCAAACCTCAGAAGCCG (21 pb)	61,20	7	2		52,38
C9 ^{ae}	F: GCTGAGAATCCACCAACCAT (20 pb)	57,87	3	2	77	50,00
	R: TTTGAGCAAACCTCAGAAGCC (22 pb)	59,71	7	3		45,45
C10 ^{ae}	F: TTTCTATTCCTGGTGGAGGGTG (23 pb)	59,99	3	0	70	47,83
	R: CACAGTTGTTGTGGGGAATGG (21 pb)	59,66	4	0		52,38
C11 ^{ae}	F: TCTATTTCCTGGTGGAGGGTG (21 pb)	58,80	3	0	70	52,38
	R: AACACAGTTGTTGTGGGGAA (20 pb)	57,78	5	0		45,00
C12 ^{ae}	F: CGCAATTGTCTTCCCAACTCA (21 pb)	59,12	6	1	92	47,62
	R: AATCGCCGAGAGTCCCAAAG (20 pb)	60,11	5	0		55,00
C13 ^{ae}	F: ACGCAATTGTCTTCCCAACTC (21 pb)	59,12	6	0	98	47,62
	R: TCAACAATCGCCGAGAGTCC (20 pb)	60,11	5	1		55,00
C14 ^{ae}	F: ACAAGTGTTCAGCTGTTGATATTG (25 pb)	58,56	6	2	72	36,00
	R: TATTTACCCACCTGCCCCT (20 pb)	60,85	2	0		55,00
C15 ^{ae}	F: GAGATTTACAAGTGTTCAGCTGTT (25 pb)	58,27	6	2	82	36,00
	R: AATTATTTACCCACCTGCCC (21 pb)	58,53	5	0		47,62
C16 ^{ae}	F: GAGCAGGTTCAAAATACGACA (22 pb)	58,94	2	0	70	45,45
	R: TGGGAAGTGTACTACGTGCT (20 pb)	58,38	5	2		50,00
C17 ^{ae}	F: TGAGCAGGTTCAAAATACGAC (22 pb)	58,94	4	1	72	45,45
	R: TTGGGAAGTGTACTACGTGCT (21 pb)	59,03	5	2		47,62
ty5 ^{bc}	F: TTGTTCTGATGGTCTGGT (20 pb)	56,65	3	0	112	45,00
	R: TTTCTTCATCTGGGTTTCA (20 pb)	54,44	2	1		40,00
Ty2 ^{de}	AATCTGCCAAACGACCCCTT (20 pb)	59,89	3	1	100	50,00
	TGCTGAGCAGGTGACATCAA (20 pb)	59,60	7	2		50,00

^aMarcadores utilizados para la búsqueda y obtención de recombinantes a *Ty-1* en relación al objetivo 2.1. ^bMarcadores utilizados para la búsqueda y obtención de los genotipos estudiados en relación al objetivo 2. ^cMarcador utilizado tras los correspondientes retrocruces durante la introgresión del gen *ty-5* en relación al objetivo 1. ^dMarcador utilizado tras los primeros retrocruces en relación a la introgresión del gen *Ty-2*. ^eMarcadores diseñados y puestos a punto durante la tesis doctoral.

3.2. Material vegetal

Las variedades locales de tomate Muchamiel y De la pera son muy populares en la comarca de la Vega Baja del Segura, en el sureste de España, debido a la excepcional calidad organoléptica de sus frutos. Los frutos de Muchamiel tienen una textura fundente y un sabor suave, son de tamaño grande (180 g a 300 g), aplanados y fuertemente asurcados (García-Martínez et al., 2011). Los frutos de la pera tienen una textura jugosa y firme, una elevada proporción de semillas y mucílago, y un sabor intenso. El peso de estos últimos oscila entre 75 y 125 g, mientras que la forma varía de oval-alargada a acampanada, con hombros de color verde oscuro y sin costillas (García-Martínez et al., 2012). Se estudiaron líneas de mejora de estos dos tipos varietales con todas las combinaciones homocigóticas de los genes *Ty-1* y *ty-5* (Figura 24). Obtenidas tras cinco retrocruzamientos y dos autofecundaciones, estas líneas también contienen los alelos *Tm-2a* y *Sw-5* (que confieren resistencia al virus del mosaico del tomate (ToMV) y al virus del bronceado del tomate (TSWV) respectivamente) en estado homocigótico. Como controles se utilizaron líneas de mejora con solo *Ty-1* o *ty-5* y cultivares tradicionales. A continuación, se resumen los genotipos estudiados en cada caso. El proceso de obtención de las nuevas líneas se detalla en las Figuras 25 (tipo varietal Muchamiel) y 26 (tipo varietal De la pera).

- Genotipos de las nuevas líneas de mejora utilizadas en el estudio del efecto de la introgresión: ^alíneas de mejora BC5S2 (contienen los alelos *Tm-2^a* y *Sw-5* en homocigosis).

De la pera
<hr/>
<i>Ty-1/ty-5^a</i>
<i>ss/SS^a</i>
<i>ty-5^a</i>
<i>Ty-1^a</i>

- Genotipos de las nuevas líneas de mejora utilizadas en el estudio de inoculación: ^alíneas de mejora BC5S2 (contienen los alelos *Tm-2^a* y *Sw-5* en homocigosis). ^blíneas de mejora con solo los genes *Ty-1* o *ty-5*. ^ccultivar tradicional. *el control *ty-5* hace referencia al parental donante (línea TX 468-RG, cecida por el Dr. Rafael Fernández Muñoz del IHSM La Mayora-CSIC).

<u>Muchamiel</u>	<u>De la pera</u>
<i>Ty-1/ty-5^a</i>	<i>Ty-1/ty-5^a</i>
<i>ss/SS^a</i>	<i>ss/SS^a</i>
<i>ty-5^a</i>	<i>ty-5^a</i>
<i>Ty-1^a</i>	<i>Ty-1^a</i>
Control <i>Ty-1^b</i>	Control <i>Ty-1^b</i>
Control <i>ss/SS^c</i>	Control <i>ss/SS^c</i>
Control <i>ty-5^b</i>	Control <i>ty-5^b</i>





Figura 24. Líneas de mejora utilizadas en el estudio. Fila 1, genotipos de la línea Muchamiel BC5S2-62. Fila 2, genotipos de la línea Muchamiel BC5S2-136. Fila 3, genotipos de la línea De la pera BC5S2-175. Fila 4, genotipos de la línea De la pera BC5S2-220.

1200 x ty-5

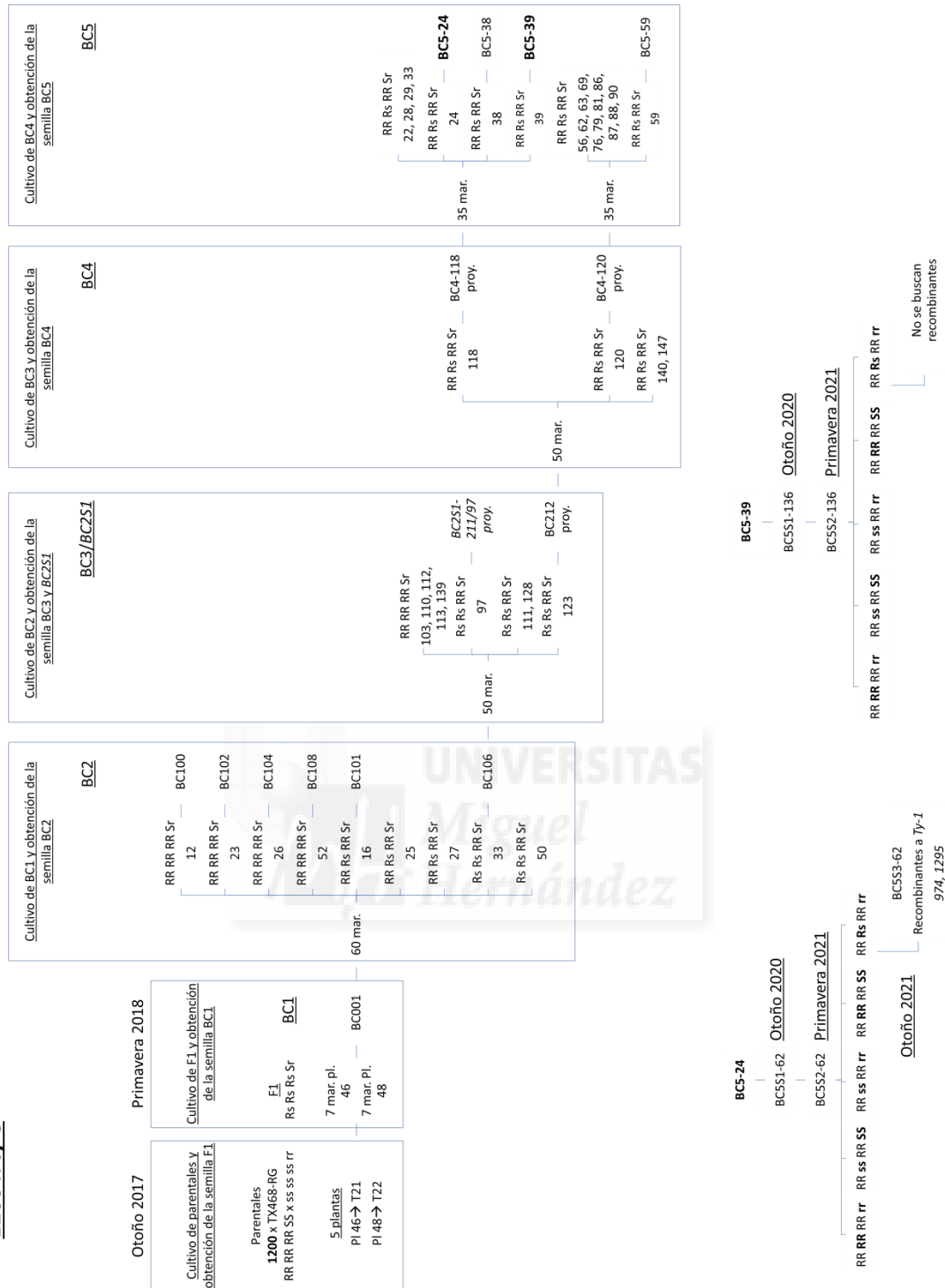


Figura 25. Proceso de obtención de las líneas Muchamiel BC5S2, tanto recombinantes como no recombinantes. Se parte de la línea 1200 (incluye los genes *Tm-2^a*, *Ty-1* y *Sw-5*) obtenida anteriormente en el programa de mejora de la EPSO-UMH, y se cruza con el parental donante de *ty-5*, la línea TX68-RG.

1406 x ty-5

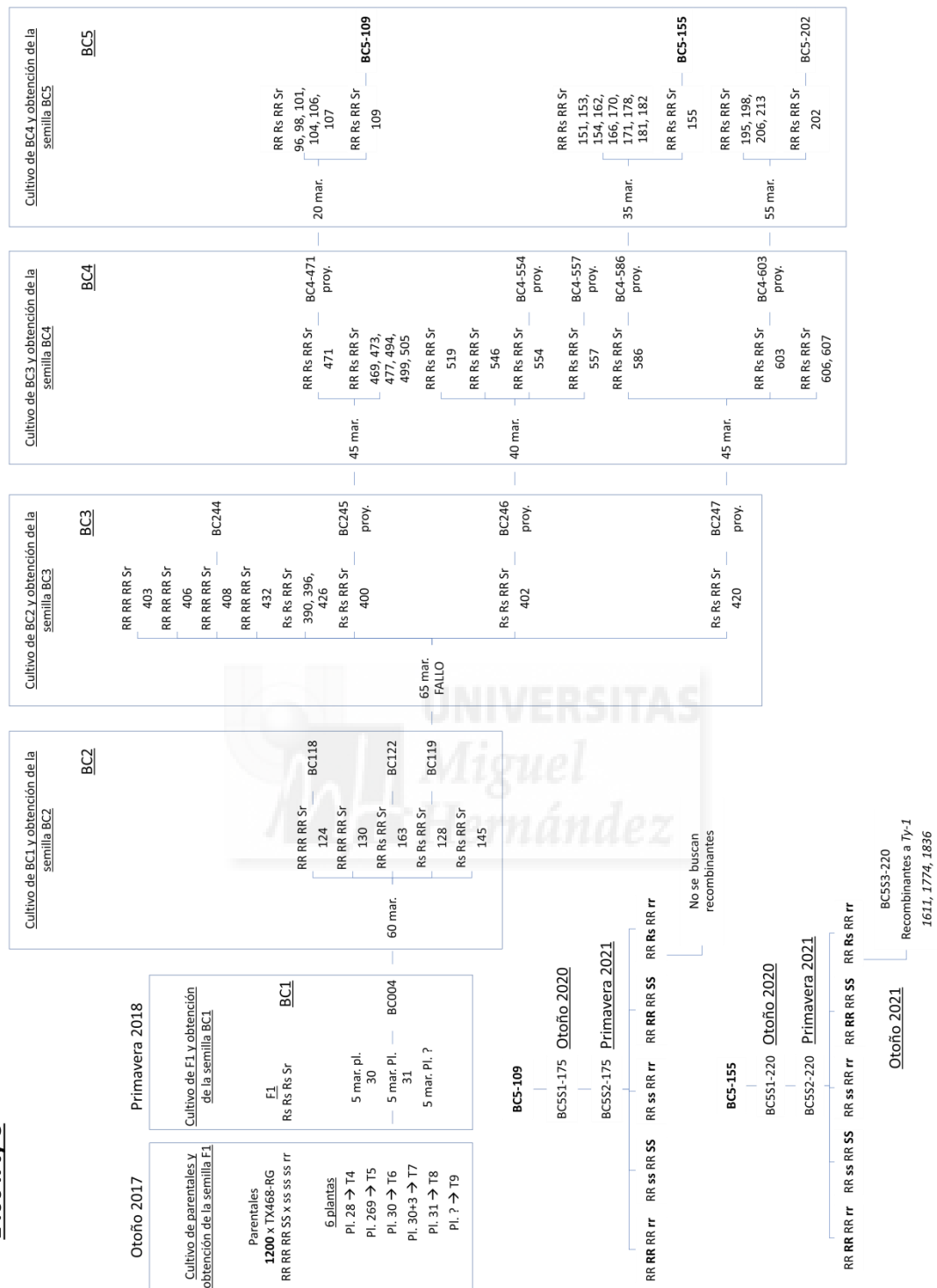


Figura 26. Proceso de obtención de las líneas De la pera BC5S2, tanto recombinantes como no recombinantes. Se parte de la línea 1406 (incluye los genes *Tm-2^a*, *Ty-1* y *Sw-5*) obtenida anteriormente en el programa de mejora de la EPSO-UMH, y se cruza con el parental donante de *ty-5*, la línea TX68-RG.

DISCUSIÓN



4. Discusión

El estudio de nuevas líneas de mejora con ciertas características para aumentar la resiliencia de las plantas frente a los desafíos propuestos, requiere de un trabajo meticuloso y costoso previo a la realización de los ensayos diseñados en campo, posterior toma de datos, realización de los correspondientes análisis y exposición de conclusiones. La obtención de estas semillas con las características deseadas hace referencia a los objetivos 1 y 2, desarrollados en el apartado de materiales y métodos por prestarse más, bajo un punto de vista estrictamente científico, a un concepto de metodología a seguir en base a un objetivo concreto que a un concepto de análisis e interpretación de resultados, como es el caso de los objetivos 3 y 4. Por tanto, a continuación se procede a resolver en base a los resultados obtenidos los objetivos 3 y 4.

Efecto de la introgresión de los genes *Ty-1* y *ty-5* en caracteres productivos, de calidad y capacidad antioxidante de los frutos de tomate

El análisis de varianza mostró diferencias estadísticamente significativas en rendimiento, peso medio, sólidos solubles totales y acidez total para cada uno de los años. En cuanto a la actividad antioxidante total, sólo se encontraron diferencias en 2022 en el método DPPH. En el caso de los fenoles totales, no se encontraron diferencias en ninguno de los años. Varios trabajos publicados han destacado el efecto negativo de la introducción de genes de resistencia debido a los propios genes y/o a la carga de ligamiento (Tanksley et al., 1998; Lewis et al., 2007; Brouwer y St Clair, 2004; Verlaan et al., 2011; Rubio et al., 2016). En este estudio, reportamos que los genotipos evaluados muestran que los BC5S2 que contienen *Ty-1*, independientemente de si contiene *ty-5* o no (RRrr y RRSS), producen un efecto negativo sobre los parámetros productivos analizados, rendimiento y peso medio del fruto. Los mayores rendimientos se encuentran en los genotipos susceptibles a ambos genes (ssSS), y en ausencia de introgresión, no hay efecto negativo. El BC5S2 de la línea UMH220 que contiene sólo *ty-5* (ssrr) muestra un ligero efecto negativo ya que los resultados son más similares a los obtenidos por el genotipo susceptible (ssSS). En el caso contrario, el BC5S2 ssrr de la línea UMH175, los resultados son más similares a los obtenidos por los genotipos que contienen *Ty-1* (RRrr y RRSS). En un estudio preliminar realizado durante el ciclo de primavera de 2021 con las mismas líneas, UMH175 y UMH220, aunque con un menor número de plantas, concluimos que la introgresión del gen *ty-5* no producía un efecto negativo sobre la producción en las líneas estudiadas, a diferencia del gen *Ty-1* (Cabrera

et al., 2023). En este caso, los resultados de la línea UMH175 difieren de los obtenidos en el estudio preliminar de 2021, aunque los resultados obtenidos por la línea UMH220 son similares. En referencia a los parámetros de calidad, la introgresión *Ty-1* también tiene un efecto negativo sobre AT, mientras que la introgresión *ty-5* no lo tiene, aunque esto es más claro en la línea UMH220, al contrario que en TSS, donde las introgresiones no son decisivas en ningún caso. Estos resultados son similares a los obtenidos por Rubio et al. (2016), quienes, además del rendimiento, estudiaron estos dos parámetros, donde el efecto de la introgresión *Ty-1* no fue decisivo para SST pero sí para AT. Para la actividad antioxidante total, tanto para los métodos ABTS y DPPH como para los fenoles totales, los valores medios obtenidos (teniendo en cuenta el 6,8% de materia seca obtenida) son similares a los mostrados por Lipan et al. en 2021. Estos autores estudiaron una variedad de tomate cherry aplicando riego deficitario (RDI), donde un ahorro del 53% de agua con el RDI de los tomates presentó, en general, un mayor peso, calibre, SST, azúcares, actividad antioxidante, licopeno, β -Caroteno, y color más rojo con un sabor a tomate más intenso. Demostramos que ni la introgresión *Ty-1* ni *ty-5* son determinantes. Aunque se observan diferencias entre algunos genotipos en 2022 para el método DPPH, al comparar los genotipos de la familia UMH175 entre sí, no hay diferencias, mientras que al comparar los de la familia UMH220, las diferencias sólo se observan entre los genotipos RRrr y RRSS.

Evaluación de la resistencia de los genes *Ty-1* y *ty-5* en plantas infectadas con TYLCV.

Todas las plantas mostraron una respuesta homogénea en función del genotipo estudiado. Los controles susceptibles (*ss/SS*) mostraron síntomas severos, especialmente a partir de los 14 dpi. En esta fase, el virus se reproduce rápidamente y se extiende por toda la planta. Los controles tolerantes (*ty-5* y *Ty-1*) retrasaron el desarrollo de la enfermedad. Los síntomas fueron muy leves y se mantuvieron constantes durante los 28 dpi. Los resultados de las líneas de mejora estudiadas con todas las combinaciones homocigóticas de los genes *Ty-1* y *ty-5* fueron coherentes con los de los controles. Los genotipos susceptibles (*ss/SS*) mostraron síntomas graves, los genotipos resistentes (*Ty-1* y *ty-5*) mostraron síntomas muy leves, y el genotipo resistente *Ty-1/ty-5* no mostró síntomas en ninguno de los tipos varietales. Las respuestas fenotípicas al TYLCV pueden clasificarse en dos grupos: los genotipos susceptibles (*ss/SS*)

para los dos genes y los genotipos resistentes (*Ty-1*, *ty-5* y *Ty-1/ty-5*), que presentan *Ty-1*, *ty-5* o ambos. En los tres estudios, los genotipos susceptibles mostraron síntomas claros (el índice de gravedad de la enfermedad (DSI) medio de los tres estudios fue de 3,94/s4) en contraste con los genotipos tolerantes (cuyo DSI medio de los tres estudios fue de 0,31/s4). El análisis de varianza de la acumulación viral cuantificada por qPCR (incluido en el estudio 3) mostró diferencias estadísticamente significativas en los dos tipos varietales, Muchamiel y De la pera. Los genotipos susceptibles (ss/SS) mostraron los niveles más altos de acumulación de virus, mientras que los genotipos resistentes (*Ty-1*, *ty-5* y *Ty-1/ty-5*) mostraron en general niveles bajos de acumulación de virus. Los genes *Ty* han mostrado diferentes niveles de tolerancia (Ji et al., 2007; 2009; Shahid et al., 2013). Se ha demostrado que todos los loci *Ty* descritos permiten la replicación del virus en diversos grados, lo que los define como portadores asintomáticos (Yan et al., 2021). En el presente estudio, principalmente durante las primeras fases, algunos genotipos resistentes no mostraron síntomas, aunque sí carga viral. Por otro lado, Pereira-Carvalho et al. (2015) sugirieron que el uso de *ty-5* es un método de mejora eficaz para reducir los daños de TYLCD, y en un estudio destinado a comprender la acumulación restringida de un aislado de la cepa Israel de TYLCV (TYLCV-IL) en TX 468-RG y evaluar cómo esta resistencia podría ayudar a limitar la propagación del virus en condiciones de campo, los investigadores descubrieron que la resistencia recesiva monogénica a TYLCV-IL en TX 468-RG (el genotipo de control *ty-5^b* en este estudio) dificultaba significativamente la infección sistémica del virus. El resultado fue una notable reducción de la transmisión del virus tanto primaria (propagación del virus a plantas sanas desde una fuente externa de vectores virulíferos) como secundaria (propagación del virus desde plantas fuente infectadas a plantas sanas). En Túnez, en condiciones de campo abierto, Elbaz et al. (2016) evaluaron un conjunto de entradas de tomate con diferentes combinaciones *Ty* (*Ty-1*, *Ty-1/Ty-2*, *Ty-1/Ty-3/Ty-2*, *Ty-2*, *Ty-2/Ty-3*, *Ty-2/Ty-3a*, *ty-2/ty-5* y *ty-5*) proporcionadas por AVRDC. Los ensayos se realizaron en 2013 y 2015 de septiembre a diciembre, cuando abundan las poblaciones de mosca blanca. El objetivo era identificar los genes específicos y las combinaciones de genes que reducían eficazmente la incidencia y la gravedad del TYLCV causado por los begomovirus tunecinos. El alelo *Ty-1/Ty-3* proporcionó el mayor nivel de resistencia. Las entradas con *Ty-1* y *Ty-1/Ty-2* fueron resistentes a TYLCD y tuvieron niveles de resistencia similares a *Ty-1/Ty-3*. Sin embargo, la línea

homocigota sólo para *ty-5* no proporcionó altos niveles de resistencia a TYLCD. *Ty-2/ty-5* mostraron reducciones del 32,35% y el 43,3% mayores en la incidencia y la gravedad de TYLCD que la entrada *ty-5*, y estas diferencias fueron significativas. En otro estudio similar, en campo abierto y durante dos temporadas de cultivo (de septiembre a febrero de 2012-2013 y 2013-2014), los autores evaluaron diferentes combinaciones con los genes *Ty-1*, *Ty-2*, *Ty-3*, *Ty-3a* y *ty-5*. Todas las líneas que contenían los genes *Ty* se comportaron mejor que los controles susceptibles, con menor incidencia de la enfermedad, gravedad y carga de ADN viral. La gravedad de los síntomas fue mayor en las líneas portadoras sólo de *Ty-2*, seguidas de las líneas homocigóticas para *Ty-3a* y *Ty-2*. Las líneas portadoras de *ty-5* o *ty-5/Ty-2* permanecieron consistentemente libres de síntomas en ambos años, y sus cargas virales medias fueron las más bajas, aunque no fueron estadísticamente diferentes de la mayoría de las otras líneas, excepto aquellas con *Ty-2* solamente (Al-Shihi et al., 2018). En el estudio actual, el genotipo *Ty-1/ty-5* fue el único que no presentó síntomas de enfermedad en ninguna fase, a pesar de mostrar carga viral. Esto significa que, como en los casos de los demás genotipos, siempre existirá la posibilidad de transmisión de la mosca blanca y de replicación del virus, lo que conducirá a altos niveles de infección y, potencialmente, a la superación de la resistencia. En el presente estudio, los resultados son bastante claros. Sin embargo, teniendo en cuenta la información disponible en otras publicaciones, es difícil establecer definitivamente el comportamiento de los genes *Ty-1* y *ty-5* debido a las variaciones que presentan las diferentes combinaciones de estos genes, el aislado de TYLCV y los distintos grados de infección. Estas diferencias pueden deberse a la diversidad de Begomovirus causantes de TYLCVD (Al-Shihi et al., 2018) y a su capacidad para superar la resistencia (Yan et al. 2021). Los genotipos de las líneas de mejora estudiadas también contenían los alelos *Tm2^a* y *Sw-5*, como se menciona en materiales y métodos, en el apartado 3.2 de material vegetal. Estos genotipos podrían influir en la respuesta de la planta a nivel de síntomas y a nivel de carga de virus, aunque el comportamiento de los genotipos que contienen *Tm-2^a* y *Sw-5* y sus homólogos sin ellos fue similar en todos los estudios realizados. Los resultados obtenidos sugieren que los alelos introgresados *Tm-2^a* y *Sw-5* no intervienen en el desarrollo de la enfermedad ni en el mecanismo de defensa proporcionado por los alelos *Ty-1* y *ty-5*.

CONCLUSIONES



5. Conclusiones

Basándonos en los resultados obtenidos en este estudio, concluimos que la introgresión del alelo *ty-5* produce un efecto ligeramente negativo sobre el rendimiento, el peso medio del fruto, los sólidos solubles totales y la acidez total. Esto contrasta con *Ty-1*, que produce un gran efecto negativo. En términos de actividad antioxidante total y fenoles totales, la introgresión de los genes *Ty-1* y *ty-5* en las líneas de mejora de la pera estudiadas no produce un efecto negativo, ya que todos los genotipos resistentes se comportan de forma similar al genotipo susceptible para ambos genes. En este estudio, hemos demostrado que tanto *Ty-1* como *ty-5*, utilizados juntos o por separado, proporcionan un nivel de resistencia alto similar, acentuándose aún más al utilizarlos conjuntamente. *ty-5* es un gen prometedor para su uso en programas de mejora, ya que aunque su introgresión produce un ligero efecto negativo en algunos caracteres, ofrece alto nivel de resistencia. La introducción de resistencias en estos tipos varietales aumenta su resiliencia en relación a la respuesta defensiva y podría contribuir a reducir el uso de pesticidas. Por otro lado, estos materiales ofrecen al agricultor una mayor protección horizontal.

Las líneas portadoras de estos genes obtenidas en la presente tesis, podrían utilizarse como líneas parentales en programas de mejora para obtener nuevos cultivares con cierto valor añadido. Esto también podría conducir al desarrollo de líneas que permitan a los agricultores guardar semillas de diferentes variedades locales para la siguiente temporada de cultivo. Además, la piramidalización proporciona una resistencia más eficaz y duradera en el tiempo. El virus encontrará más barreras para superar la resistencia e infectar la planta. La piramidalización de genes *Ty* parece ser la mejor opción para luchar contra TYLCVD. Para ello, comenzamos a introducir el *Ty-2* en 2021, con el objetivo de obtener líneas *Ty-1/ty-5/Ty-2* y aumentar la resistencia genética a TYLCV. Una vez finalizada su introgresión, el rendimiento de estos genotipos se reportará en futuras publicaciones.

REFERENCIAS



6. Referencias

- Abhary, M.; Patil, B.L.; Fauquet, C.M. Molecular Biodiversity, Taxonomy, and Nomenclature of Tomato Yellow Leaf Curl-like Viruses. In: Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease; Czosnek, H., Eds; Springer, Dordrecht, 2007. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4769-5_6
- Ahmed, M.A. Mahmoud; Neama, H. Osman; Hassan, A.A. Mohamed. Characterization of tomato yellow leaf curl virus resistance genes and genetic variability in commercial tomato F1 hybrids. *Scientia Horticulturae*. **2023**, 318. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112088>
- Alonso, A.; Vázquez-Araújo, L.; García-Martínez, S.; Ruiz, J.J.; Carbonell-Barrachina, A.A. Volatile compounds of traditional and virus-resistant breeding lines of *Muchamiel* tomatoes. *Eur Food Res Technol*, **2009a**, 230, 315–323. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1173-2>
- Alonso, A.; García-Aliaga, R.; García-Martínez, S.; Ruiz, J.J.; Carbonell-Barrachina, A.A. Characterization of spanish tomatoes using aroma composition and discriminant analysis. *Food Sci Tech Int*, **2009b**, 15(1), 47-55. <https://doi.org/10.1177/1082013208102385>
- Alonso, A.; Garcia-Martínez, S.; Grau, A.; Carbonell, P.; Rubio, F.; Ruiz, J. Genotipado mediante HRM: puesta a punto para su utilización en el programa de tomate de la EPSO-UMH. En *Libro de Actas del XIV Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas. Retos de la Nueva Agricultura Mediterránea*; Serrano, M. y Valero, D., Eds; SECH, Orihuela, Alicante, España, 2015; pp. 521-524. ISBN: 978-84-606-8547-0
- Alpert, K.B.; Grandillo, S; Tanksley, S.D. fw2.2: a major QTL controlling fruit weight is common to both red and green fruited tomato species. *Theoret. Appl. Genetics*, **1995**, 91, 994-1000. <https://doi.org/10.1007/BF00223911>
- Al-Shihi, A.A.; Peter, H.; Al-Sadi, A.M.; Al-Yahyai, R.A.; Briddon, R.W.; Deadman, M.; Shahid, M.S. Evaluation of tomato inbred lines for resistance to the tomato yellow leaf curl disease complex in Oman. *Crop Prot*. **2018**, 110, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.04.001>
- Anbinder, I.; Reuveni, M.; Azari, R.; Paran, I.; Nahon, S.; Shlomo, H.; Chen, L.; Lapidot, M.; Levin, I. Molecular dissection of Tomato leaf curl virus resistance in tomato line TY172 derived from *Solanum peruvianum*. *Theor. Appl. Genet.* 2009, 119, 519–530. <https://doi.org/10.1007/s00122-009-1060-z>

Bai, Y.; Lindhout, P. Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future? *Annals of Botany*, **2007**, *100*, 1085-1094. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm150>

Bellon, M.R.; van Etten, J. 2014. Climate change and on-farm conservation of crop landraces in centres of diversity. En *Plant genetic resources and climate change*; Jackson, M.; Ford-Lloyd, B.; Parry, M., Eds; CAB International, Wallingford, Reino Unido, 2014, pp. 137-150.

Blanca, J.; Cañizares, J.; Cordero, L.; Pascual, L.; Díez, M.J.; Nuez, F. Variation revealed by SNP genotyping and morphology provides insight into the origin of the tomato. *PLoS ONE*. 2012, *7*(10): e48198. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048198>

Blanca, J; Montero-Pau, J; Sauvage, C.; Genomic variation in tomato, from wild ancestors to contemporary breeding accessions. *BMC Genomics*, **2015**, *16*,257. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1444-1>

Brommonschenkel, S.H.; Tanksley, S.D. Map-based cloning of the tomato genomic region that spans the *Sw-5* tospovirus resistance gene in tomato. *Mol Gen Genet*, 1997, *256*, 121–126. <https://doi.org/10.1007/s004380050553>

Brouwer, D.J.; St Clair, D.A. Fine mapping of three quantitative trait loci for late blight resistance in tomato using near isogenic lines (NILs) and sub-NILs. *Theor. Appl. Genet.* 2004, *108*, 628–638. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1469-8>

Cabrera, J.A.; Carbonell, P.; Salinas, J.F.; Grau, A.; Alonso, A.; García-Martínez, S.; Ruiz, J.J. Introducción del gen *Ty-2* en el Programa de mejora genética de Variedades Tradicionales de Tomate del CIAGRO-UMH. En *Actas del II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria*; LIMENCOP Orihuela, Spain, 2021.

Cabrera, J.A.; Carbonell, P.; Salinas, J.F.; Alonso, A.; Grau, A.; Ruiz, J.J.; García-Martínez, S. Diseño de marcadores moleculares ligados al gen *Ty-1* para la búsqueda de individuos recombinantes que hayan perdido parte de la carga de ligamiento asociada al gen *Ty-1*. En *Libro de Resúmenes del III Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria*; LIMENCOP Orihuela, Spain, 2022.

Cabrera, J.A.; Murcia, V.D.; Carbonell, P.; Salinas, J.F.; Grau, A.; Alonso, A.; Hernández, F.; Ruiz, J.J.; García-Martínez, S. Determinación de la capacidad antioxidante total en líneas de mejora de tomate Muchamiel y De la pera con diferentes genotipos para los genes *Ty-1* y *ty-5*. En *Actas del IV Congreso Universitario Internacional en Innovación y sostenibilidad Agroalimentaria*; García Martínez, S.; Serrano, M. Eds; Orihuela, Alicante, España, 2023, pp. 14-18. ISBN: 978-84-09-57202-1

Cabrera, J.Á.; Carbonell, P.; Salinas, J.F.; Grau, A.; Alonso, A.; Hernández, F.; Ruiz, J.J.; García-Martínez, S. Effect of Introgression of *Ty-1* and *ty-5* Genes on Productivity, Quality, and Antioxidant Compounds in De la Pera Tomato Breeding Lines. *Agriculture* **2024**, *14*, 1192. <https://doi.org/10.3390/agriculture14071192>

Caicedo, A.L.; Schaal, B.A. Population structure and phylogeography of *Solanum pimpinellifolium* inferred from a nuclear gene. *Mol Ecol.* **2004**, *13*(7), 1871–1882. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02191.x>

Caramé, E. El galeón de Manila. Hombres de hierro en barcos de madera. Revista digital de la Real Academia de Cultura Valenciana. Segunda época – número 2, 2017; pp. 12.

Caro, M.; Verlaan, M.G.; Julián, O.; Finkers, R.; Wolters, A.M.A.; Hutton, S.F.; Scott, J.W.; Kormelink, R.; Visser, R.G.F.; Díez, M.J.; Pérez de Castro, A.; Bai, Y. Assessing the genetic variation of *Ty-1* and *Ty-3* alleles conferring resistance to tomato yellow leaf curl virus in a broad tomato germplasm. *Molecular Breed*, **2015**, *35*(6), 132. <https://doi.org/10.1007/s11032-015-0329-y>

Carrillo, J.M. Erosión genética y reemplazo de variedades tradicionales. En *Las variedades locales en la mejora genética de plantas*; Ruiz de Galarreta, J.I.; Prohens, J.; Tierno, R. (Eds); Vitoria-Gasteiz, España, 2016; pp. 29-41. ISBN: 978-84-457-3395-0

Casas, A.; Torres-García, I.; Parra, F.; Torres, J. Centros de origen y diversificación de plantas cultivadas en América. En: *De los cultivos nativos y el cambio del clima. Hallazgos (Huánuco y Apurímac)*; Eds: Torres-Guevara, J.J.; Parra, F.; Casas, A.; Cruz, A.; Perú, 2019; pp. 23-56. ISBN: 978-612-00-4349-3.

Chakrabarti, M.; Zhang, N.; Sauvage, C.; Muños, S.; Blanca, J.; Cañizares, J.; Díez, M.J.; Schneider, R.; Mazourek, M.; McClead, J.; Causse, M.; van der Knaap, E. A cytochrome P450 regulates a domestication trait in cultivated

tomato. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2013**, *110*(42), 17125-17130. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307313110>

Child, A. A synopsis of Solanum subgenus Potatoe (G. DON) (D'ARCY) (Tuberarium (DUN.) BITTER (s.1.)). *Journal of Botanical Taxonomy and Geobotany*, 1990, 101 (5-6), pp. 209-235. <https://doi.org/10.1002/fedr.19901010502>

Chunwongse, J.; Doganlar, S.; Crossman, C.; Jiang, J.; Tanksley, S.D. High-resolution genetic map of the *Lv* resistance locus in tomato. *Theor Appl Genet.* **1997**, *95*, 220–223. <https://doi.org/10.1007/s00122005055>

Cohen, S.; Antignus, Y. Tomato Yellow Leaf Curl Virus, Whitefly-Borne Geminivirus of Tomatoes. In *Advances in Disease Vector Research*; Kerry F. Harris, Eds; Texas A&M University: College Station, Texas, USA, 1994; Volume 10, pp. 259-288.

Cohen, S.; Harpaz, I. Periodic, rather than continual acquisition of new tomato virus by its vector, the tobacco whitefly (*Bemisia tabaci* Gennadius). *Entomol. Exp. Appl.* **1964**, *7*, 155–166

Cong, B.; Liu, J.; Tanksley, S.D. Natural alleles at a tomato fruit size quantitative trait locus differ by heterochronic regulatory mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*(21), 13606-13611. <https://doi.org/10.1073/pnas.172520999>

Cubero, J.I. De plantas silvestres a las variedades tradicionales: domesticación y evolución. En *Las variedades locales en la mejora genética de plantas*; Ruiz de Galarreta, J.I.; Prohens, J.; Tierno, R. (Eds); Vitoria-Gasteiz, España, 2016; pp. 9-27. ISBN: 978-84-457-3395-0

Czosnek, H. Tomamto Yellow Leaf Curl Viruses (*Geminiviridae*). En *Encyclopedia of Virology, 4th Edition, vol.3*; Bamford, D.H.; Zuckerman, M. Eds; Oxford: Academic press, UK, 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21246-6>

Darwin, C. On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life. JohnMurray; Londres, 1859.

Darwin, C. The Variation of animals and plants under domestication. John Murray; Londres, 1868.

Díez, M.J.; Mallor, C.; Blanca, J.M.; De la Rosa, L. Retos que deben afrontar los bancos de germoplasma como recurso para hacer frente al cambio climático. En *Influencia del cambio climático en la mejora genética de plantas*; Brunton, J.G.; Pérez, O.; Cos, J.E.; Ruiz, L.; Sánchez, E., Eds; SECH; SEG, Murcia, España, 2018; pp. 47-76. ISBN: 978-84-948233-8-1

Distefano, M.; Mauro, R.P.; Page, D.; Giuffrida, F.; Bertin, N.; Leonardi, C. Aroma volátiles in tomato fruits: The role of genetic, preharvest and postharvest factors. *Agronomy* **2022**, *12*(2), 376. <https://doi.org/10.3390/agronomy12020376>

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

Esquinas-Alcázar, J.T. Genetic resources of tomatoes and wild relatives. A global report. IBPGR Secretariat, Rome, 1981; pp. 65.

Esquinas-Alcázar, J.T.; Nuez, F. Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate. En *El cultivo del tomate*; Eds: Nuez, F.; Mundi-Prensa; Madrid, España, 1995; pp. 15-42. ISBN: 84-7114-549-9

FAO Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Trabajo estratégico de la FAO para una alimentación y agricultura sostenibles. FAO, 2017. I6488ES/1/01.17

FAO Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Comisión de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura. Recursos Fitogenéticos, 2025. <https://www.fao.org/cgrfa/topics/plant-genetic-resources/es>

FAOSTAT. Estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Datos sobre alimentación y agricultura 2023, 2025. <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL>

Fauquet, C.M.; Maxwell, D.P.; Gronenborn, B.; Stanley, J. Revised proposal for naming geminiviruses. *Arch. Virol.* **2000**, *145*, 1743–1761. <https://doi.org/10.1007/s007050070089>

Ford-Lloyd, B.; Engels, J.M.M.; Jackson, M. Genetic resources and conservation challenges under the threat of climate change, pp. 16-37. En: *Plant genetic*

resources and climate change; Jackson, M.; Ford-Lloyd, B.; Parry, M., Eds; CAB International, Wallingford, Reino Unido, 2014, pp. 16-37.

Fowler, C. Seeds on ice in the Arctic Circle, the Svalbard Global Seed Vault is not waiting for doomsday, but is a secure backup for crop diversity. *American Scientist*, **2016**, *104*(5), 304-308. <https://doi.org/10.1511/2016.122.304>

Frary, A.; Nesbitt, T.C.; Frary, A.; Grandillo, S.; van der Knapp, E.; Cong, B.; Liu, J.; Meller, J.; Elber, R.; Alpert, K.B.; Tanksley, S.D. *fw2.2*: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science*, **2000**, *289*(5476), 85-88. <https://doi.org/10.1126/ciencia.289.5476.85>

Fridman, E.; Carrari, F.; Liu, Y.S.; Fernie, A.R.; Zamir, D. Zooming in on a quantitative trait for tomato yield using interspecific introgressions. *Science*, **2004**, *305*(5691), 1786–1789. <https://doi.org/10.1126/science.1101666>

Friedmann, M.; Lapidot, M.; Cohen, S.; Pilowsky, M. A novel source of resistance to Tomato yellow leaf curl virus exhibiting a symptomless reaction to viral infection. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **1998**, *123*, 1004–1007. <https://doi.org/10.21273/JASHS.123.6.1004>

Fu, Y.B. Vulnerability of Plant Genetic Resources Conserved Ex situ. *Crop Science*, **2017**, *57*, 2314-2328. <https://doi.org/10.2135/cropsci2017.01.0014>

Gao, L.; Gonda, I.; Sun, H.; Ma, Q.; Bao, K.; Tieman, D.M. Burzynski-Chang, E.A.; Fish, T.L.; Stromberg, K.A.; Sacks, G.L.; Thannhauser, T.W.; Foolad, M.R.; Díez, M.J.; Blanca, J.; Canizares, J.; Xu, Y.; van der Knapp, E.; Huang, S.; Klee, H.J.; Giovannoni, J.J.; Fei, Z. The tomato pan-genome uncovers new genes and a rare allele regulating fruit flavor. *Nat Genet.* **2019**, *51*(6), 1044-1051. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0410-2>

García-Martínez, S.; Grau, A.; Alonso, A.; Rubio, F.; Valero, M.; & Ruiz, J. J. UMH 1200, a Breeding Line within the Muchamiel Tomato Type Resistant to Three Viruses. *HortScience horts*, **2011**, *46*(7), 1054-1055. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.46.7.1054>

García-Martínez, S.; Grau, A.; Alonso, A.; Rubio, F.; Valero, M.; Ruiz, J. UMH 1203, a Multiple Virus-resistant Fresh-market Tomato Breeding Line for Open-field Conditions. *HortScience Horts.* **2012**, *47*, 124–125. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.47.1.124>

García-Martínez, S.; Grau, A.; Alonso, A.; Rubio, F.; Valero, M.; Ruiz, J.J. UMH 1422 and UMH1415: Two fresh-market tomato breeding lines resistant to Tomato mosaic virus and Tomato spotted wilt virus. *HortScience* 2014, 49, 1465–1466. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.49.11.1465>

García-Martínez, S., Grau, A.; Alonso, A.; Rubio, F.; Carbonell, P.; Ruiz, J. J. UMH 916, UMH 972, UMH 1093, UMH 1127, AND UMH 1139: Four freshmarket breeding lines resistant to viruses within the muchamiel tomato type. *HortScience*, 2015, 50(6), 927-929. <https://doi.org/10.21273/hortsci.50.6.927>

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

Grandillo, S.; Ku, H.; Tanksley, S. Identifying the loci responsible for natural variation in fruit size and shape in tomato. *Theor Appl Genet.* 1999, 99, 978–987. <https://doi.org/10.1007/s001220051405>

Grandillo, S.; Chetelat, R.; Knapp, S.; Spooner, D.M.; Peralta, I.E.; Cammareri, M.; Perez, O.; Tripodi, P.; Termolino, P.; Chuisano, M.L.; Ercolano, M.R.; Frusciante, L.; Monti, L.; Pignone, D. *Solanum* sect. *Lycopersicon*. En: Wild crop relatives: genomics and breeding resources. Volume 5—vegetables; Kole, C. (eds); Springer, Berlin, Heidelberg, 2011, pp. 129–216. https://doi.org/10.1007/978-3-642-20450-0_9

Granell, A.; Rambla, J.L. Biosynthesis of volatile compounds. En *The molecular biology and biochemistry of fruit ripening*; Seymour, G.B.; Poole, M.; Giovannoni, J.J.; Tucker, G.A., Eds; Blackwell publishing Ltd, 2013, pp. 135-1361. <https://doi.org/10.1002/9781118593714>

Hajjar, R.; Hodgkin, T. The use of wild relatives in crop improvement: a survey of developments over the last 20 years. *Euphytica* 2007, 156, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9363-0>

Hall, T.J. Resistance at the *Tm-2* locus in the tomato to tomato mosaic virus. *Euphytica*, 1980, 29, 189–197. <https://doi.org/10.1007/BF00037266>

Hanelt, P.; Knüpffer, H.; Hammer, K. Erna Bennett (5 August 1925–3 January 2012). *Genet Resour Crop Evol.*, 2012, 59, 967–970. <https://doi.org/10.1007/s10722-012-9872-0>

Hanson, P.M.; Bernacchi, D.; Green, S.; Tanksley, S.D.; Muniyappa, V.; Padmaja, A.S.; Chen, H.; Kuo, G.; Fang, D.; Chen, J. Mapping a Wild Tomato Introgression Associated with Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistance in a Cultivated Tomato Line. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **2000**, *125*, 15–20. <https://doi.org/10.21273/JASHS.125.1.15>

Hanson, P.M.; Green, S.K.; Kuo, G. *Ty-2*, a gene on chromosome 11 conditioning geminivirus resistance in tomato. In *Report of the Tomato Genetics Cooperative*; Scott, J.W., Eds; University of Florida: Wimauma, FL, USA, 2006; Volume 56, pp. 17–18.

Harvey, M.; Quilley, S.; Beynon, H. Exploring the tomato: transformations of nature, society and economy. Edward Edgar Publishing Ltd, 2002, Cheltenham, UK. pp. 304. ISBN: 978-1843761891

Holle, M.; Rick, C.M.; Hunt, D.G. Catalog of collection of green-fruited *Lycopersicon* species and *Solanum pennellii* found in watersheds of Peru. *Tomato Genetics Cooperative Report*, **1978**, *28*, 49-78.

Holle, M.; Rick, C.M.; Hunt, D.G. Catalog of collection of green-fruited *Lycopersicon* species and *Solanum pennellii* found in watersheds of Peru. *Tomato Genetics Cooperative Report*, **1979**, *29*, 63-91.

Hutton, S.F.; Scott, J.W.; Schuster, D.J. Recessive Resistance to Tomato yellow leaf curl virus from the Tomato Cultivar Tyking Is Located in the Same Region as *Ty-5* on Chromosome 4. *HortScience Horts.* **2012**, *47*, 324–327. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.47.3.324>.

Hutton, S.F.; Scott, J.W. *Ty-6*, a major begomovirus resistance gene located on chromosome 10. In *Report of the Tomato Genetics Cooperative*; Scott, J.W., Eds; University of Florida: Wimauma, FL, USA, 2014; 64, pp. 14–18.

Hutton, S.F.; Scott, J.W. Fla. 7907C: A Fla. 7907 Near-isogenic Tomato Inbred Line Containing the *Begomovirus* Resistance Gene, *Ty-1*. *HortScience horts.* **2017**, *52*(4), 658-660. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI11827-17>

Jenkins, J.A. The origin of the cultivated tomato. *Econ Bot.* 1948, *2*, 379-392. <https://doi.org/10.1007/BF02855942>

Ji, Y.; Scott, J.W.; Hanson, P.; Graham, E.; Maxwell, D.P. Sources of resistance, inheritance, and location of genetic loci conferring resistance to members of the

tomato-infecting begomoviruses. In *Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease: Management, Molecular Biology, Breeding for Resistance*; Henryk, C., Eds; Springer: Dordrecht, The Netherlands; 2007a; pp. 343–362.

Ji, Y.; Schuster, D.J.; Scott, J.W. *Ty-3*, a begomovirus resistance locus near the Tomato yellow leaf curl virus resistance locus *Ty-1* on chromosome 6 of tomato. *Mol. Breed.* **2007b**, *20*, 271–284. <https://doi.org/10.1007/s11032-007-9089-7>

Ji, Y.; Scott, J.W.; Schuster, D.J. Toward Fine Mapping of the Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistance Gene *Ty-2* on Chromosome 11 of Tomato. *HortScience horts.* **2009**, *44*, 614–618. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.44.3.614>

Kaloo, G.; Banerjee, M.K. Transfer of Tomato leaf curl virus resistance from *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum* to *L. esculentum*. *Plant Breed.* **1990**, *105*, 156–159. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1990.tb00469.x>

Kasrawi, M.A.; Suwvan, M.A.; Mansour, A. Sources of resistance to Tomato-yellow-leaf-curl-virus (TYLCV) in *Lycopersicon* species. *Euphytica* **1988**, *37*, 61–64. <https://doi.org/10.1007/BF00037224>

Kheyr-Pour, A.; Gronenborn, B.; Czosneck, S. Agroinoculation of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) over comes the virus resistance of wild *Lycopersicon* species. *Plant Breeding* **1994**, *112*, 228–233. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1994.tb00675.x>

Khoury, C.K.; Brush, S.; Costich, D.E.; Curry, H.A.; de Haan, S.; Engels, J.M.M.L; Guarino, L.; Hoban, S.; Mercer, K.L.; Miller, A.J.; Nabhan, G.P.; Perales, H.R.; Richards, C.; Riggins, C.; Thormann, I. Crop genetic erosion: understanding and responding to loss of crop diversity. *New Phytol.*, **2022**, *233*, 84–118. <https://doi.org/10.1111/nph.17733>

Kil, Eui-Joon.; Byun, Hee-Seong.; Hwang, Hyunsik.; Lee, Kyeong-Yeoll.; Choi, Hong-Soo.; Kim, Chang-Seok.; Lee, Sukchan. Tomato Yellow Leaf Curl Virus Infection in a Monocotyledonous Weed (*Eleusine indica*). *Plant Pathol J.* **2021**, *37*, 641–651. <https://doi.org/10.5423/PPJ.FT.11.2021.0162>

Klee, H.J.; Tieman, D.M. The genetics of fruit flavor preferences. *Nat Rev Genet.* **2018**, *19*, 347–356. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0002-5>

Knapp, S; Peralta, I.E. The tomato (*Solanum lycopersicum* L., Solanaceae) and Its botanical relatives. En: *The tomato genome. Compendium of Plant Genomes*; Causse,

M.; Giovannoni, J.; Bouzayen, M.; Zouine, M. (Eds); Springer, Berlin, Heidelberg, 2016; pp. 7-21. https://doi.org/10.1007/978-3-662-53389-5_2

Lapidot, M.; Karniel, U.; Gelbart, D.; Fogel, D.; Evenor, D.; Kutsher, Y.; Makhbash, Z.; Nahon, S.; Shlomo, H.; Chen, L.; Reuveni, M.; Levin, I. A Novel Route Controlling Begomovirus Resistance by the Messenger RNA Surveillance Factor Pelota. *PLoS Genet.* **2015**, *11*, e1005538. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005538>

Laterrot, H. Resistance genitors to Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV). *Tomato Leaf Curl. Nswl.* 1992, *1*, 2–4.

Lázaro, A.; Fernandez, I.C.; Cabello, F.; de Lorenzo, C. Catálogo de tomates tradicionales de la Comunidad de Madrid. IMIDRA (Eds); Madrid, España, 2014; pp. 85. ISBN-10: 84-451-3502-3. ISBN-13: 978-84-451-3502-0

Lefeuvre, P.; Martin, D.P.; Harkins, G.; Lemey, P.; Gray, A.J.A.; Meredith, S.; Lakay, F.; Monjane, A.; Lett, J.M.; Varsani, A.; Heydarnejad, J. La propagación del virus del rizado amarillo de las hojas del tomate desde Oriente Medio hasta el mundo. *PLoS Pathog.* 2010, *6*(10): e1001164. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001164>

Lewis, R.S.; Linger, L.R.; Wolff, M.F.; Wernsman, E.A. The negative influence of N-mediated TMV resistance on yield in tobacco: Linkage drag versus pleiotropy. *Theor Appl Genet.* **2007**, *115*, 169–178. <https://doi.org/10.1007/s00122-007-0552-y>

Lin, T.; Zhu, G.; Zhang, J.; Xu, X.; Yu, Q.; Zheng, Z.; Zhang, Z.; Lun, Y.; Li, S.; Wang, X.; Huang, Z.; Li, J.; Zhang, C.; Wang, T.; Zhang, Y.; Wang, A.; Zhang, Y.; Lin, K.; Li, C.; Xiong, G.; Xue, Y.; Mazzucato, A.; Causse, M.; Fei, Z.; Giovannoni, J.J.; Chetelat, R.T.; Zamir, D.; Städler, T.; Li, J.; Ye, Z.; Du, Y.; Huang, S. Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. *Nat Genet.* **2014**, *46*, 1220–1226. <https://doi.org/10.1038/ng.3117>

Long, J. De tomates y jitomates en el siglo XVI. En: *Estudios de Cultura Náhuatl*; León-Portilla, M; Borgonio, G. (Eds); México D.F., 1995, *25*, 239–252. ISSN: 0071-1675.

López Piñero, J.M.; López-Terrada, M.L. La influencia española en la introducción en Europa de las plantas americanas (1493-1623). En: Cuadernos valencianos de historia de la medicina y de la ciencia LIII serie A (monografías);

Instituto de estudios documentales e históricos sobre la ciencia. UV-CSIC; Valencia, España, 1997; pp. 153.

López-Terrada, M.L. La historia de la llegada del tomate a Europa: una primera aproximación, 2022. Proyecto TRADITOM. <https://traditom.eu/es/proyecto/historia/>

Luckwill, L.C. The genus *Lycopersicon*: an historical, biological and taxonomic survey of the wild and cultivated tomatoes. *Aberdeen University Studies*, 1943; 120, pp. 1-44.

MAPA. Anuario de Estadística del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación 2023. Gobierno de España. 2025. <https://www.mapa.gob.es/estadistica/pags/anuario/2023/FORMATO%20PDF/AE23-C07/7.6.27.3.pdf>

Marshall, J.A.; Knapp, S.; Davey, M.R.; Power, J.B.; Cocking, E.C.; Bennett, M.D.; Cox, A.V. Molecular systematics of *Solanum* section *Lycopersicum* (*Lycopersicon*) using the nuclear ITS rDNA region. *Theor Appl Genet.* 2001, 103 (8), pp. 1216–1222. <https://doi.org/10.1007/s001220100671>

McClellan, P.E.; Hanson, M.R. Mitochondrial DNA sequence divergence among *Lycopersicon* and related *Solanum* species. *Genetics*, 1986, 112(3), pp-649–667. <https://doi.org/10.1093/genetics/112.3.649>

Messeguer, R.; Ganal, M.; de Vicente, M.C.; Young, N.D.; Bolan, H.; Tanksley, S.D. High resolution RFLP map around the root knot nematode resistance gene (*Mi*) in tomato. *Theoret. Appl. Genetics*, 1991, 82, 529–536. <https://doi.org/10.1007/BF00226787>

Miller, J.C.; Tanksley, S.D. RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theor Appl Genet.* 1990, 80(4): 437–448. <https://doi.org/10.1007/BF00226743>

Ministerio para la transición ecológica y el reto demográfico. Vicepresidencia tercera del gobierno de España. Convenio sobre la diversidad biológica, 2024. <https://miteco.gob.es>

Mueller, L.A.; Tanksley, S.D.; Giovannoni, J.J.; van Eck, J.; Stack, S.; Choi, D.; Kim, B.D.; Chen, M.; Cheng, Z.; Li, C.; Ling, H.; Xue, Y.; Seymour, G.; Bishop,

G.; Bryan, G.; Sharma, R.; Khurana, J.; Tyagi, A.; Chattopadhyay, D.; Singh, N.K.; Stiekema, W.; Lindhout, P.; Jesse, T.; Lankhorst, R.K.; Bouzayen, M.; Shibata, D.; Tabata, S.; Granell, A.; Botella, M.A.; Giuliano, G.; Frusciante, L.; Causse, M.; Zamir, D. The tomato sequencing project, the first cornerstone of the international Solanaceae project (SOL). *Comp Funct Genom*, **2005**, *6*(3), 153–158. <https://doi.org/10.1002/cfg.468>

Moriones, E.; Arnó, J.; Accotto, G.P.; Noris, E.; Cavallarin, L. First report of Tomato yellow leaf curl virus in Spain. *Plant Dis*. **1993**, *77*, 953.

Muller, C.H. A revision of the genus *Lycopersicon*. En *Miscellaneous publication n° 382*; United States Department of Agriculture, Eds; Washington, D.C., 1940; pp. 1-29.

Naciones Unidas. Agenda 2030: objetivos de Desarrollo sostenible. 2024a. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/objetivos-de-desarrollo-sostenible/>

Naciones Unidas. Cumbre del futuro: nuestra agenda común. Nueva York, 2024b. <https://www.un.org/es/summit-of-the-future>

Navas-Castillo, J.; Sanchez-Campos, S.; Díaz, J.A.; Sáez-Alonso, E.; Moriones, E. First report of Tomato yellow leaf curl virus-Is in Spain: Coexistence of two different geminiviruses in the same epidemic outbreak. *Plant Dis*. **1997**, *81*, 1461. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.12.1461B>

Navas-Castillo, J.; Fiallo-Olivé, E.; Sánchez-Campos, S. Virus emergentes transmitidos por mosca blanca. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2011**, *49*, 219–248. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095235>

Nesbitt, T.C.; Tanksley, S.D. Comparative sequencing in the genus **lycopersicon**: implications for the evolution of fruit size in the domestication of cultivated tomatoes. *Genetics*, **2002**, *162*(1), 365–379. <https://doi.org/10.1093/genetics/162.1.365>

Nuez, F. Desarrollo de nuevos cultivares. En *El cultivo del tomate*; Eds: Nuez, F.; Mundi-Prensa; Madrid, España, 1995; pp. 625-669. ISBN: 84-7114-549-9.

Ozores-Hampton, M.; Stansly, P. A.; McAvoy, E. Evaluation of Round and Roma-type Tomato Varieties and Advanced Breeding Lines Resistant to Tomato Yellow Leaf Curl Virus in Florida. *HortTechnology hortte*. **2013**, *23*(5), 689-698. <https://doi.org/10.21273/HORTTECH.23.5.689>.

Paliwal, R.L. Enfermedades del maíz. En: *El maíz en los trópicos: mejoramiento y producción*; Paliwal, R.L. (Eds); FAO, Roma, 2001.

Palmer, J.D.; Zamir, D. Chloroplast DNA evolution and phylogenetic relationships in *Lycopersicon*. *Proc Natl Acad Sci*. **1982**, 79(16): 5006–5010. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.16.5006>

Peralta, I.E.; Spooner, D.M. Granule-bound starch synthase (GBSSI) gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon* [Mill.] Wettst. Subsection *Lycopersicon*). *American journal of Botany*, **2001**, 88 (10), 1888-1902. <https://doi.org/10.2307/3558365>

Peralta, I.E.; Spooner, D.M. Morphological characterization and relationships of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon* [Mill.] Wettst. subsection *Lycopersicon*). *Syst Bot Monogr*. **2005**, 104, pp. 227-257. ISSN: 0161-1542. <http://hdl.handle.net/11336/107948>

Peralta, I.E.; Knapp, S.; Spooner, D.M. New species of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*: Solanaceae) from north ern Peru. *Systematic Botany*, **2005**, 30(2), pp. 424-434. <https://doi.org/10.1600/0363644054223657>

Peralta, I.E.; Knapp, S.; Spooner, D.M.. Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. *Tomato Genetics Cooperative Report*, **2006**, 56, 6-12.

Peralta, I.E.; Spooner, D.M.; Knapp, S. Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sections *Lycopersicoides*, *Juglandifolia*, *Lycopersicon*; Solanaceae). *Syst Bot Monogr*. 2008a, 84, 1-186. ISSN: 0737-8211

Pereira-Carvalho, R.C.; Díaz-Pendón, J.A.; Fonseca, M.E.N.; Boiteux, L.S.; Fernández-Muñoz, R.; Moriones, E.; Resende, R.O. Recessive Resistance Derived from Tomato cv. Tyking-Limits Drastically the Spread of Tomato Yellow Leaf Curl Virus. *Viruses* **2015**, 7, 2518-2533. <https://doi.org/10.3390/v7052518>

Pérez de Castro, A.M. Mejora genética para la resistencia a los geminivirus Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) y Tomato yellow leaf curl sardinia virus (TYLCSV) en tomate [Tesis doctoral]. Universidad Politécnica de Valencia: Valencia, Spain, 2007. <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/135825>

Pérez de Castro, A.; Díez, M.J.; Nuez, F. Exploiting partial resistance to Tomato yellow leaf curl virus derived from *Solanum pimpinellifolium* UPV 16991. *Plant Dis.* **2008**, *92*, 1083-1090. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-7-1083>

Pérez de Castro, A.; Julián, O.; Díez, M.J. Genetic control and mapping of *Solanum chilense* LA1932, LA1960 and LA1971-derived resistance to Tomato yellow leaf curl disease. *Euphytica* **2013**, *190*, 203–214. <https://doi.org/10.1007/s10681-012-0792-z>

Picó, B.; Díez, M.J.; Nuez, F. Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. The Tomato yellow leaf curl virus—A review. *Sci. Hortic.* **1996**, *67*, 151–196. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(96\)00945-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(96)00945-4)

Pilowsky, M.; Cohen, S. Tolerance to Tomato yellow leaf curl virus derived from *L. peruvianum*. *Plant Dis.* **1990**, *74*, 248–250.

Pistorius, R. Scientists, plants and politics: a history of the plant genetic resources movement. IPGRI, Roma, 1997, pp. 134. ISBN-10: 92-9043-308-6. ISBN-13: 978-92-9043-308-8.

Plucknett, D. L.; Smith, N. J. H.; Williams, J. T.; Anishetty, N. M. Gene banks and the world's food. Princeton, New Jersey, EE.UU, 1987, pp. 247. ISBN: 0-691-08438-6.

Pons, C.; Casals, J.; Palombieri, S.; Fontanet, L.; Riccini, A.; Rambla, J.L.; Ruggiero, A.; Figás, M.R.; Plazas, M.; Koukounaras, A.; Picarella, M.E.; Sulli, M.; Fisher, J.; Ziarsolo, P.; Blanca, J.; Cañizares, J.; Cammareri, M.; Vitiello, A.; Batelli, G.; Kanellis, A.; Brouwer, M.; Finkers, R.; Nikoloudis, K.; Soler, S.; Giuliano, G.; Grillo, S.; Grandillo, S.; Zamir, D.; Mazzucato, A.; Causse, M.; Díez, M.J.; Prohens, J.; Monforte, A.J.; Granell, A. Atlas of phenotypic, genotypic and geographical diversity present in the European traditional tomato. *Horticulture Research* **2022**, *9*, uhac112. <https://doi.org/10.1093/hr/uhac112>

Prasanna, H.C.; Sinha, D.P.; Rai, G.K.; Krishna, R.; Kashyap, S.P.; Singh, N.K.; Singh, M.; Malathi, V.G. Pyramiding *Ty-2* and *Ty-3* genes for resistance to monopartite and bipartite tomato leaf curl viruses of India. *Plant Pathol.* **2014**, *64*, 256–264. <https://doi.org/10.1111/ppa.12267>

Prescott-Allen, R.; Prescott-Allen, C. Genes from the wild: using wild genetic resources for food and raw materials. En: *Natural Resource Management*; International Institute for Environment and Development (Eds); London, UK, 1988.

Prohens, J.; Gramazio, P.; Plazas, M.; Dempewolf, H.; Kilian, B.; Díez, M.J.; Fita, A.; Herraiz, F.J.; Rodríguez-Burruezo, A.; Soler, S.; napp, S.; Vilanova, S. Introgressomics: a new approach for using crop wild relatives for adaptation to climate change. *Euphytica* **2017**, 213:158. <https://doi.org/10.1007/s10681-017-1939-9>

Pujol, J. Agricultura y crecimiento económico: las innovaciones biológicas en la cerealicultura europea, 1820-1940. *Revista de historia industrial*, **2002**, 21, 63-68. ISSN: 1132-7200

Quer, J. Flora Española o historia de las plantas que se crían en España. Ibarra, J., Eds; Madrid, España, 1762-84; 6 vols, pp. 3172.

Razifard, H.; Ramos, A.; Della Valle, A.L.; Bodary, C.; Goetz, E.; Manser, E.J.; Li, X.; Zhang, L.; Visa, S.; Tieman, D.; van der Knaap, E.; Caicedo, A.L. Genomic Evidence for Complex Domestication History of the Cultivated Tomato in Latin America. *Molecular Biology and Evolution*, **2020**, 37(4), 1118-1132. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz297>

Reina, J.; Jiménez, J.; Bejarano, E.R.; Guerra, J.M.; Cuadrado, I.M.; García, C. El virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV). *Hortofruticultura*. 1994, 6, 36-40.

Ren, Y.; Tao, X.; Li, D.; Yang, X.; Zhou, X. *ty-5* Confers Broad-Spectrum Resistance to Geminiviruses. *Viruses* **2022**, 14, 1804. <https://doi.org/10.3390/v14081804>

Rick, C.M. *Lycopersicon*. Wiggins, I.L.; Porter, D.M. Eds; Stanford University Press, Palo Alto, California, USA, 1971: pp. 468-471.

Rick, C.M. Potential genetic resources in tomato species: clues from observations in native habitats. En: *Genes, enzymes and populations*; Srb, A.M., Eds; Nueva York, 1973; pp. 255-269.

Rick, C.M.; Zobel, R.W.; Fobes, J.F. Four peroxidase Loci in red-fruited tomato species: genetics and geographic distribution. *Proc Natl Acad Sci*. **1974**, 71(3), 835-839. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.3.835>

Rick, C.M. Tomato, ***Lycopersicon esculentum*** (Solanaceae). En *Evolution of crop plants*; Simmonds, N.W. (Eds); Londres, 1976, pp. 268–273.

Rick, C.M. The tomato. *Sci. Amer.* **1978**, 239 (2), 76-87.

Rick, C.M. Biosystematic studies in *Lycopersicon* and closely related species of *Solanum*. En: *The biology and taxonomy of Solanaceae*. Linnean society Symposium series 7; Hawkes, J.G.; Lester, R.N.; Skelding, D. (Eds); Academic Press, New York, USA, 1979; pp. 667-677.

Rick, C.M. Tomato resources of South America reveal many genetic treasures. *Diversity*, **1991**, 7, 54-56.

Rick, C.M.; Holle, M. Andean *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*: genetic variation and its evolutionary significance. *Economic Botany* **1990**, 44(3), 69–78. <https://doi.org/10.1007/BF02860476>

Rick, C.M.; Chetelat, R.T. Utilization of related wild species for tomato improvement. En *I International Symposium on Solanacea for Fresh Market*; Fernández-Muñoz, R; Cuartero, J.; Gómez-Guillamón, M.L., Eds; ISHS Acta horticulturae 412, 1995. pp. 21-38. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1995.412.1>

Rodríguez, R.; Tabares, J. M.; Medina, J. A. 1984. El cultivo moderno del tomate. Eds: Mundi-Prensa; Madrid, España, 1984; pp. 206. ISBN: 84-7114-146-9

Rodríguez, G.R.; Muños, S.; Anderson, C.; Sim, S-C.; Michel, A.; Causse, M.; McSpadden Gardener, B.B.; Francis, D.; van der Knaap, E. Distribution of **SUN**, **OVATE**, **LC**, and **FAS** in the Tomato Germplasm and the Relationship to Fruit Shape Diversity. **Plant Physiology**, **2011**, 156(1), 275–285. <https://doi.org/10.1104/pp.110.1675777>

Rojas, M. R.; Hagen, C.; Lucas, W. J.; Gilbertson, R. L. Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annual review of phytopathology*, **2005**, 43, 361–394. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135939>

Rojas, M.R. Los begomovirus. En *Bean golden mosaic and other diseases of common bean caused by whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America*; Francisco José Morales Garzón, Eds; Centro Internacional de Agricultura Tropical: Palmira (Valle), Colombia, 2000; pp. 87-98.

Rubio, F.; Alonso, A.; García-Martínez, S.; Ruiz, J.J. Introgression of virus-resistance genes into traditional tomato varieties (*Solanum lycopersicum* L.): Effects on yield and quality. *Sci Hort.* **2016**, *198*, 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.11.025>

Ruiz, J.J.; Alonso, A.; García-Martínez, S.; Valero, M.; Blasco, P.; Ruiz-Bevia, F. Quantitative analysis for flavour volatiles detects differences among closely related traditional cultivars of tomato. *J Sci Food Agric.* **2005**, *85*, 54-60. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1879>

Ruiz de Galarreta, J.I.; Gramazio, P.; Prohens, J. Mejora genética frente al cambio climático. En *Influencia del cambio climático en la mejora genética de plantas*; Brunton, J.G.; Pérez, O.; Cos, J.E.; Ruiz, L.; Sánchez, E., Eds; SECH; SEG, Murcia, España, 2018; pp. 15-46. ISBN: 978-84-948233-8-1

Saavedra, G.; Jana, C.; Kehr, E. Hortalizas para procesamiento agroindustrial. Temuco, Chile, 2019. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Boletín N° 411, pp. 272. ISSN: 0717-4829

Sánchez-Campos, S.; Navas-Castillo, J.; Camero, R.; Soria, C.; Díaz, J. A.; Moriones, E. Displacement of Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV)-Sr by TYLCV-Is in Tomato Epidemics in Spain. *Phytopathology* **1999**, *89*(11), 1038–1043. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.11.1038>

Sarfatti, M.; Katan, J.; Fluhr, R.; Zamir, D. Un marcador RFLP en tomate vinculado al gen de resistencia *I2* de *Fusarium oxysporum*. *Theoret. Appl. Genetics*, **1989**, *78*, 755–759. <https://doi.org/10.1007/BF00262574>

Schauer, N.; Semel, Y.; Roessner, U.; Gur, A.; Balbo, I.; Carrari, F.; Pleban, T.; Perez-Melis, A.; Bruedigam, C.; Kopka, J.; Willmitzer, L.; Zamir, D.; Fernie, A.R. Comprehensive metabolic profiling and phenotyping of interspecific introgression lines for tomato improvement. *Nat Biotechnol.* **2006**, *24*, 447–454. <https://doi.org/10.1038/nbt1192>

Scott, J.W.; Stevens, M.R.; Barten, J.H.M.; Thome, C.R.; Polston, J.E.; Schuster, D.J.; Serra, C.A. Introgression of resistance to whitefly-transmitted geminiviruses from *Lycopersicon chilense* to tomato. En *Bemisia: 1995 Taxonomy, Biology, Damage, Control and Management*; Gerling, D., Mayer, R.T., Eds.; Intercept Ltd.: Andover, UK, 1995; pp. 357–367.

Scott, J.W.; Hutton, S.F.; Freeman, J.H. Fla. 8638B and Fla. 8624 Tomato Breeding Lines with Begomovirus Resistance Genes *ty-5* Plus *Ty-6* and *Ty-6*, respectively. *HortScience horts.* **2015**, *50*, 1405–1407. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.50.9.1405>.

Shahid, M.S.; Ito, T.; Kimbara, J.; Onozato, A.; Natsuaki, K.T.; Ikegami, M. Evaluation of tomato hybrids carrying *Ty-1* and *Ty-2* loci to Japanese monopartite begomovirus species. *J Phytopathol.* **2013**, *161*, 205–209. <https://doi.org/10.1111/jph.12041>

Shahriari, Z.; Su, X.; Zheng, K.; Zhang, Z. Advances and Prospects of Virus-Resistant Breeding in Tomatoes. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 15448. <https://doi.org/10.3390/ijms242015448>

Silva, J.P.H.; Zebini, F.M. Taxonomic Classification of Geminiviruses Based on Pairwise Sequence Comparisons. En *Plant-Virus Interactions*; Elizabeth P.B. Fontes y Kristiina Mäkinen, Eds; Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular: Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil; and Departamen of Agricultural Sciences: University of Helsinki, Helsinki, Finland, 2023; pp. 21-32.

Smith, A.F. The tomato in America: early history, culture and cookery. University of South Carolina Press, 1994; pp. 224. ISBN-10: 1570030006. ISBN-13: 978-1570030000

Spooner, D.M.; Peralta, I.E.; Kmapp, S. Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [*Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst.]. *Taxon*, **2005**, *54*(1), pp. 43-61. <https://doi.org/10.2307/25065301>

Tanksley, S.D.; Grandillo, S.; Fulton, T.M.; Zamir, D.; Eshed, Y.; Petiard, V.; Lopez, J.; Beck-Bunn, T. Advanced backcross QTL analysis in a cross between an elite processing line of tomato and its wild relative *L. pimpinellifolium*. *Theoret. Appl. Genetics*, **1996**, *92*, 213–224. <https://doi.org/10.1007/BF00223378>

Tanksley, S.D.; Bernachi, D.; Emmatty, D.; Eshed, Y.; Inai, S.; Lopez, J.; Petiard, V.; Sayama, H.; Uhlig, J.; 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* **1998**, 99, 77–83.
<https://doi.org/10.1023/A:1018320232663>

Tanksley, S.D. The genetic, developmental, and molecular bases of fruit size and shape variation in tomato. *The Plant Cell*, **2004**, 16(1), 181-189.
<https://doi.org/10.1105/tpc.018119>

Taylor, I.B. Biosystematics of the tomato. En *The tomato crop: a scientific basis for improvement*; Atherton, J.G.; Rudich, J. Eds; Chapman and hall, London, UK, 1986; pp. 1-34.

Tieman, D. M.; Zeigler, M.; Schmelz, E. A.; Taylor, M. G.; Bliss, P.; Kirst, M.; Klee, H. J. Identification of loci affecting flavour volatile emissions in tomato fruits. *Journal of Experimental Botany* **2006a**, 57(4), 887-896.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erj074>

Tieman, D.; Taylor, M.; Schauer, N.; Fernie, A. R.; Hanson, A. D.; Klee, H. J. Tomato aromatic amino acid decarboxylases participate in synthesis of the flavor volatiles 2-phenylethanol and 2-phenylacetaldehyde. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2006b**, 103(21), 8287-8292.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0602469103>

Tieman, D.; Zhu, G.; Resende Jr, M.F.R.; Lin, T.; Nguyen, C.; Bies, D.; Rambla, J.L.; Beltran, K.S.O.; Taylor, M.; Zhang, B.; Ikeda, H.; Liu, Z.; Fisher, J.; Zemach, I.; Monforte, A.; Zamir, D.; Granell, A.; Kirst, M.; Huang, S.; Klee, H. A chemical genetic roadmap to improved tomato flavor. *Science*, **2017**, 355, 391–394.
<https://doi.org/10.1126/science.aal1556>

Tomato Genome Consortium. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, **2012**, 485, 635–641.
<https://doi.org/10.1038/nature11119>

van Andel, T.; Vos, R.A.; Michels, E.; Stefanaki, A. Sixteenth-century tomatoes in Europe: who saw them, what they looked like, and where they came from. *PeerJ*. **2022**, 10, e12790. <https://doi.org/10.7717/peerj.12790>

van der Knaap, E.; Tanksley, S.D. The making of a bell pepper-shaped tomato fruit: identification of loci controlling fruit morphology in Yellow Stuffer tomato. *Theor Appl Genet.* **2003**, 107(1), 139-147. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1224-1>

Vasudeva, R.S.; Sam Raj, J. A leaf curl disease of tomato. *Phytopathology* **1948**, *38*, 364–369.

Verlaan, M.G.; Szinay, D.; Hutton, S.F.; de Jong, H.; Visser, R.G.F.; Scott, J.W.; Bai, Y. Chromosomal rearrangements between tomato and *Solanum chilense* hamper mapping and breeding of the TYLCV resistance gene *Ty-1*. *Plant J.* **2011**, *68*, 1093–1103. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04762.x>

Verlaan, M.G.; Hutton, S.F.; Ibrahim, R.M.; Kormelink, R.; Visser, R.G.; Scott, J.W.; Edwards, J.D.; Bai, Y. The Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistance Genes *Ty-1* and *Ty-3* are Allelic and Code for DFDGD-Class RNA-Dependent RNA Polymerases. *PLoS Genet.* **2013**, *9*, e1003399. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003399>

Vidavsky, F.; Czosnek, H. Tomato breeding lines resistant and tolerant to tomato yellow leaf curl virus issued from *Lycopersicon hirsutum*. *Phytopathology* **1998**, *88*, 910–914. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.9.910>

Villand, J.; Skroch, P.W.; Lai, T.; Hanson, P.; Juo, C.G. Nienhuis, J.; Genetic variation among tomato accessions from primary and secondary centers of diversity. *Crop Science*, **1998**, *38*(5): 1339–1347. <https://doi.org/10.2135/cropsci1998.0011183X003800050032x>

Viquez-Zamora, M.; Caro, M.; Finkers, R.; Tikunov, Y.; Bovy, A.; Visser, R.G.F.; Bai, Y.; van Heusden, S. Mapping in the era of sequencing: high density genotyping and its application for mapping TYLCV resistance in *Solanum pimpinellifolium*. *BMC Genomics* **2014**, *15*, 1152. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1152>

Walter, J. M. Hereditary resistance to disease in tomato. *Annual Review of Phytopathology*, **1967**, *5*(1), 131-160. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.05.090167.001023>

Wang, D.; Seymour, G.B. Tomato flavor: lost and found? *Molecular Plant*, **2017**, *10*(6), 782-784. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.04.010>

Wang, Y.; Jiang, J.; Zhao, L.; Zhou, R.; Yu, W.; Zhao, T. Application of Whole Genome Resequencing in Mapping of a Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistance Gene. *Sci Rep.* **2018**, *8*, 9592. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27925-w>

w

Wolters, A.-M.A.; Caro, M.; Dong, S.; Finkers, R.; Gao, J.; Visser, R.G.F.; Wang, X.; Du, Y.; Bai, Y. Detection of an inversion in the TY-2 region between *S. lycopersicum* and *S. habrochaites* by a combination of de novo genome assembly and BAC cloning. *Theor Appl Genet.* **2015**, *128*(10), 1987-1997. <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2561-6>

Yan, Z.; Pérez-de-Castro, A.; Díez, M.J.; Hutton, S.F.; Visser, R.G.F.; Wolters, A.-M.A.; Bai, Y.; Li, J. Resistance to Tomato Yellow Leaf Curl Virus in Tomato Germplasm. *Front Plant Sci.* **2018**, *9*, 1198. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01198>

Yan, Z.; Wolters, A.-M.A.; Navas-Castillo, J.; Bai, Y. The Global Dimension of Tomato Yellow Leaf Curl Disease: Current Status and Breeding Perspectives. *Microorganisms* **2021**, *9*, 740. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040740>

Zamir, D.; Michelson, I.E.; Zakay, Y.; Navot, N.; Zeidan, M.; Sarfatti, M.; Eshed, Y.; Harel, E.; Pleban, T.; van Oss, H.; et al. Mapping and introgression of a tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, Ty-1. *Theor. Appl. Genet.* **1994**, *88*, 141–146. <https://doi.org/10.1007/BF00225889>

Zhang, N.; Brewer, M.T.; van der Knaap, E. Mapeo fino de *fw3.2* que controla el peso del fruto en tomate. *Theor Appl Genet.* **2012**, *125*, 273–284. <https://doi.org/10.1007/s00122-012-1832-8>

Zuriaga, E.; Blanca, J.; Nuez, F. Classification and phylogenetic relationships in *Solanum* section *Lycopersicon* based on AFLP and two nuclear gene sequences. *Genetic Resources and Crop Evolution* **2009**, *56*(5), 663–678. <https://doi.org/10.1007/s10722-008-9392-0>

PUBLICACIONES



Article

Effect of Introgression of *Ty-1* and *ty-5* Genes on Productivity, Quality, and Antioxidant Compounds in De la Pera Tomato Breeding Lines

José Ángel Cabrera, Pedro Carbonell, Juan Francisco Salinas, Adrian Grau , Aranzazu Alonso , Francisca Hernández , Juan José Ruiz  and Santiago García-Martínez * 

Instituto de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental (CIAGRO-UMH), Miguel Hernández University, Ctra. de Beniel km 3.2, 03312 Orihuela, Spain; j.cabrera@umh.es (J.Á.C.); pcarbonell@umh.es (P.C.); juan.salinas@goumh.es (J.F.S.); agrau@umh.es (A.G.); aalonso@umh.es (A.A.); francisca.hernandez@umh.es (F.H.); juanj.ruiz@umh.es (J.J.R.)

* Correspondence: sgarcia@umh.es; Tel.: +34-96-674-9632

Abstract: Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is a crop that is affected by more than a hundred viral species. De la pera is a local varietal type of tomato that is very popular in southeastern Spain. However, it is highly susceptible to several viruses, such as *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), which is considered one of the most important diseases of tomato crops and is a limiting factor for production in both outdoor and protected crops, making it difficult to eradicate. This study shows the effect of gene introgression on the performance of traditional lines of De la pera by combining two genes that offer tolerance to TYLCV, *Ty-1* and *ty-5*, on some yield and quality traits and on the antioxidant capacity of tomato fruits. Two pear tomato breeding families, UMH175 and UMH220, were evaluated. Four lines from each of the families with all homozygous combinations of the *Ty-1* and *ty-5* genes were studied. The results showed that the introgression of the *ty-5* allele produced a slight negative effect on yield, mean fruit weight, total soluble solids, and titratable acidity, in contrast to *Ty-1*, which produced a large negative effect. None of the introgressions showed a negative effect on the antioxidant compounds. *ty-5* is a promising gene for use in breeding programs.

Keywords: *Begomovirus*; viral diseases; gene pyramiding; *Ty* genes; molecular marker; total phenolic content; antioxidant activity



Citation: Cabrera, J.Á.; Carbonell, P.; Salinas, J.F.; Grau, A.; Alonso, A.; Hernández, F.; Ruiz, J.J.; García-Martínez, S. Effect of Introgression of *Ty-1* and *ty-5* Genes on Productivity, Quality, and Antioxidant Compounds in De la Pera Tomato Breeding Lines. *Agriculture* **2024**, *14*, 1192. <https://doi.org/10.3390/agriculture14071192>

Academic Editor: Thomas Thomidis

Received: 1 May 2024

Revised: 16 July 2024

Accepted: 17 July 2024

Published: 19 July 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is one of the most consumed and economically valuable crops worldwide. It is affected by more than a hundred viral species according to the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV); the main ones are included in the genera *Begomovirus*, *Orthotospovirus*, *Tobamovirus*, *Potyvirus*, and *Crinivirus* [1]. *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) is considered one of the most significant diseases affecting tomato crops in many tropical and subtropical regions worldwide. It belongs to the family *Geminiviridae*, genus *Begomovirus*, whose genome is composed of a circular single-stranded DNA molecule [2]. Symptoms include dwarfism, upward leaf puckering, vein clearing, and excessive branching and stunting, all of which are associated with mild to severe mosaic symptoms and partial or total plant sterility [3]. The disease is transmitted via the tobacco whitefly, *Bemisia tabaci* Gennadius [4], with high population outbreaks often associated with high disease incidence. Depending on the severity of the infections, yield loss can reach 100% [5]. In Spain, the disease was first detected in 1992 in greenhouses in Murcia [6] and Almería [7], attributable to a Sardinian species (*Tomato yellow leaf curl Sardinia virus*, TYLCSV). Five years later, following on from some more severe episodes, the presence of the species *Tomato yellow leaf curl virus* was detected [8]. The occurrence of TYLCVD is highly dependent on chemical control aimed at reducing whitefly populations;

yet, due to the development of resistance in vectors and the loss of natural enemies, it is difficult to eliminate the disease among crops [5]. Therefore, an increasingly demanding international market and inexorable respect for the environment render genetic resistance the best strategy to control viral diseases.

The introduction of TYLCV-resistant alleles into cultivated tomatoes from wild species began in 1974 [9] and was successfully completed by several researchers [10–17]. To date, six TYLCV resistance loci have been identified (Table 1). Zamir et al. [16] found *Ty-1* on chromosome six of *S. chilense* accession LA1969. *Ty-2* was later mapped to chromosome 11 [17–19]. *Ty-3* was located on chromosome six of *S. chilense* accessions LA1932 and LA2779 [20] near the *Ty-1* locus, suggesting a genetic link between *Ty-1* and *Ty-3* [21]. In 2013, Verlaan et al. [22] accurately mapped *Ty-1* and *Ty-3*, concluding that the *Ty-3* assigned region of approximately 71 kb overlapped with the *Ty-1*-containing region. The *Ty-4* gene was also mapped in *S. chilense* accession LA1932 but on chromosome three [23]. Later, in another study designed to map the loci controlling TYLCV resistance in TY172, they identified a recessive QTL called *Ty-5* near the *SINAC1* marker on chromosome four [2]. The University of Florida's tomato breeding program developed numerous breeding lines with *Begomovirus* resistance derived from Tyking, a hybrid bred by Royal Sluis (Enkhuizen, The Netherlands). Molecular-marker-assisted analysis confirmed that the TYLCV resistance offered by Tyking was not controlled by the *Ty-1*, *Ty-2*, *Ty-3*, and *Ty-4* genes, and several of these lines were consequently tested with the *Ty-5* CAPS marker, *SINAC1*. The results showed that the Tyking-derived allele was recessive, so the authors suggested that the TY172-derived locus be renamed *ty-5* to reflect the recessive gene action. Tyking-associated resistance likely corresponds to that of TY172, although allelism of the genes remains to be demonstrated [24]. In 2015, Lapidot et al. [25] delimited the *ty-5* locus in a single gene encoding the tomato homolog of the messenger RNA surveillance factor Peló. Finally, by analyzing a Fla.8638B X Fla.7987 F2 population, the effect of a *Begomovirus* resistance gene on chromosome ten, named *Ty-6*, was confirmed [26].

Table 1. TYLCV resistance loci identified in wild species.

Gen	Accession	Species	Chromosome	Reference
<i>Ty-1</i>	LA1969	<i>S. chilense</i>	6	[16,22]
<i>Ty-2</i>	B6013	<i>S. habrochaites</i>	11	[11,17,19]
<i>Ty-3</i>	LA1932, LA2779	<i>S. chilense</i>	6	[20–22]
<i>Ty-4</i>	LA1932	<i>S. chilense</i>	3	[23]
<i>ty-5</i>	TY172	<i>S. peruvianum</i>	4	[2,10,24,25]
<i>Ty-6</i>	LA1938	<i>S. chilense</i>	10	[26]

The genes described above offer partial resistance to the virus. With molecular-marker-assisted pyramiding, it is possible to obtain plant materials that offer more effective and longer-lasting resistance over time, facilitating the management of the cultivation of traditional and commercial varieties, both outdoors and in greenhouses. Using a combination of genes, this strategy provides higher levels of resistance, resulting in the virus encountering more barriers to overcome this resistance and infecting the plant. Several studies have evaluated different gene combinations to determine their behavior against TYLCV [27–30], but a priori, none of the lines carrying the *Ty-1* and *ty-5* genes, at least initially, have been studied. It is important to evaluate this *Ty-1/ty-5* combination to ascertain the response of these tolerant genes.

Introgression of the *Ty-1* gene produces a negative effect on productive and quality traits depending on the growing conditions and genetic background [31]. This is because recombination does not occur in a fragment of approximately 35.5 megabases due to two chromosomal mutations produced on chromosome 6 of the source of resistance, *Solanum chilense* accession LA1969. It is thus difficult to eliminate the genome of the wild

species during backcrossing [32]. The search for recombinants is an alternative method for eliminating part of the genome of the wild species, so another line of work associated with this study was carried out. To search for recombinant individuals, several molecular markers close to the *Ty-1* gene were designed in order to identify individuals that contain *Ty-1* and do not contain some of the designed markers. This translates into a deletion of part of the *S. chilense* genome, decreasing the negative effect of introgression and offering resistance. All markers are based on SNPs from Illumina's Tomato Infinium Array and were tuned for visualization with the high-resolution melting technique [33]. Promising studies have been conducted with the same traditional pear lines (UMH175 and UMH220), as well as others of the Muchamiel varietal type, albeit recombinant (data to be published). These lines carry the *Ty-1* and *ty-5* alleles but have lost part of the introgressed fragment of the wild species linked to *Ty-1*. The hope is that in future trials, these traditional varietal types will maintain acceptable levels of production without compromising their distinctive organoleptic and morphological qualities.

The aim of this study is to demonstrate the effect of gene introgression on the performance of traditional lines of the De la pera varietal type. It combines two genes offering tolerance to TYLCV, *Ty-1*, and *ty-5*, and examines their impact on various yield and quality traits, as well as on the antioxidant capacity of tomato fruits.

2. Materials and Methods

Due to the organoleptic quality of its fruit, De la pera is a very popular local variety of tomato in the Vega Baja del Segura region in southeastern Spain. The fruits have a juicy and firm texture, a high proportion of seeds and mucilage, and an intense flavor. Their weight ranges from 75 to 125 g, while their shape varies from elongated oval to bell-shaped, with dark green shoulders and no ribs [34]. However, like most tomato landraces, De la pera cultivars are highly susceptible to several viruses, including *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) and *Tomato leaf curl virus* (ToLCV) (genus *Begomovirus*), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) (genus *Orthotospovirus*), *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tomato mosaic virus* (ToMV) and *Tomato Brown rugose fruit virus* (ToBRFV) (genus *Tobamovirus*), *Potato virus Y* (PVY) and *Chilli veinal mottle virus* (ChiVMV) (genus *Potyvirus*), and *Tomato chlorosis virus* (ToCV) (genus *Crinivirus*), among others [1].

2.1. Plant Material

Two pear tomato breeding families, UMH175 and UMH220, were evaluated. Four lines from each of the families with all homozygous combinations of the *Ty-1* and *ty-5* genes [RR rr (*Ty-1/ty-5*), ss SS (*ss/SS*), ss rr (*ss/ty-5*), and RR SS (*Ty-1/ss*)] were studied. These lines also contain the *Tm-2^a* and *Sw-5* alleles in the homozygous state.

2.1.1. Genealogy

In 1998, the CIAGRO-UMH breeding group started a breeding program of traditional varieties in the area with the aim of introducing resistance to the three main viruses affecting tomato cultivation (ToMV, TSWV, and TYLCV) and obtaining pure lines, either for use by farmers to obtain seeds across each crop cycle or as parental donor lines for the breeding program.

De la Pera UMH1203

UMH1203 is obtained by crossing a local P21 De la Pera line with the commercial cultivar Anastasia-F1 (Seminis Vegetable Seeds, Saint Louis, MO, USA), followed by six generations of backcrossing with the De la Pera line. After five additional generations of self-fertilization and selection, pure UMH 1203, homozygous for the three introgressed virus resistance genes, was selected from a single BC6S5 family, whose seed was multiplied by self-pollination [34]. Anastasia was used as a donor parent for the *Tm-2^a*, *Sw-5*, and *Ty-1* genes [34,35], which confer resistance to ToMV, TSWV, and TYLCV, respectively. P21 pear

was used as a recurrent parent previously selected for fruit morphology, high yield, and uniformity [34] from a collection of several local accessions donated by farmers in the region.

De la Pera UMH1406

In the BC6 stage of UMH1203, simultaneous with the self-fertilization, backcrossing was continued for two more generations. From the BC8 result, UMH1406 was selected, and two self-fertilizations were carried out, with UMH1406 being a BC8S2 line.

De la Pera UMH175 and UMH220

Due to the threat posed by TYLCV, since there are no materials that offer complete resistance to this viral disease, the *ty-5* gene was introgressed in order to complement the resistance of *Ty-1*. UMH1406, a carrier of *Tm-2^a*, *Sw-5*, and *Ty-1*, was crossed with the TX 468-RG breeding line, a donor of *ty-5*, on loan from Dr Rafael Fernández Muñoz of the Institute of Subtropical and Mediterranean Horticulture “La Mayora” (UMA-CSIC). Finally, after five generations of backcrossing with UMH1406 and two self-fertilizations, the UMH 175 and 220 lines with different combinations of the *Ty-1* and *ty-5* genes were selected. In each generation of the entire process, molecular-marker-assisted selection was used to select plants carrying the resistance genes. In addition, during each generation of backcrossing, high selection pressure was applied for pear characteristics (bell shape, green shoulder, tolerance to Blossom-end rot, BER) and good agronomic performance [36].

2.2. Field Test

De la pera lines UMH175 and UMH220 were grown in a net greenhouse at the CIAGRO-UMH facilities at the Escuela Politécnica Superior de Orihuela (Alicante, Spain), with four randomly distributed replicates of between six and seven plants of each of the four genotypes and for each of the two families (see Supplementary Materials). The first study was conducted during the spring–summer cycle in 2022 and replicated in 2023 (Table 2). The plants were grown to one stem with a planting frame of 1.0 m between rows and 0.40 m between plants, under management and fertilization conditions typical of the area (Table 2), providing inorganic fertilizers in the irrigation water. An organic amendment was made to improve the physical, chemical, and biological properties of the soil, incorporating 2.5 kg/m² of commercial sheep manure pellets with an organic matter content of 65% of the dry weight. The irrigation water was taken from the Segura River with a conductivity of approximately 1.6 dS/m. Crop water requirements were calculated using the FAO Penman–Monteith model. The reference evapotranspiration (ET_o) was obtained from the La Basca station located at Los Alamos in the municipality of Beniel (Spain, Lat: 38°2′4.33″, Lon: 0°59′58.72″; X: 675540, Y:4211532) belonging to the Agricultural Information System Network of the Region of Murcia. In 2022, symptoms of *Fusarium oxysporum* were detected in the final stage of the crop. In 2023, the presence of *Phytophthora infestans* was detected during the initial stage of the crop and *Fusarium oxysporum* during the final stage. No plants were found to be infected by ToMV, TSWV, or TYLCV in either year.

Table 2. Cultivation and fertilization dates for 2022 and 2023.

Dates	2022	2023
Sowing	11 February	7 February
Planting	29 April *	4 April
Beginning of harvest	13 July	10 July
End of harvest	03 August	26 July
Phase	Fertilizer units	Overall Fertilization
1 Vegetative development	1 N–2 P ₂ O ₅ –1 K ₂ O–1 CaO	375 N–225 P ₂ O ₅ –550 K ₂ O–190 CaO
2 Flowering and fruit development	1 N–1 P ₂ O ₅ –1 K ₂ O–1 CaO	
3 Ripening of the fruit	1 N–0.3 P ₂ O ₅ –2 K ₂ O–1 CaO	

* In 2022, the transplant was delayed due to rainfall.

2.3. Parameters Assessed

2.3.1. Yield and Average Fruit Weight

Production is counted per plant and expressed in kg/plant. Average fruit weight is expressed in g/fruit.

2.3.2. Total Soluble Solids and Titratable Acidity

The fruits used in the analysis of total soluble solids (TSS) and titratable acidity (TA) were selected per replicate and in a homogeneous ripening stage one week after observing the color change of the fruits. Four to five fruits per replicate and genotype were selected from each of the lines. Both TSS and TA analyses were obtained in duplicate. Results are expressed as °Brix and % citric acid/100 g fresh tissue for TSS and TA, respectively. The content of total soluble solids was determined using an Atago PR-100 digital refractometer (Atago, Bellevue, WA, USA) at 20 °C. Titratable acidity was analyzed using a CRISON pHmatic 23 (Crison, Barcelona, Spain) with 0.01 mol/L of NaOH and is expressed as % citric acid.

2.3.3. Total Antioxidant Activity and Total Phenolic Compounds

The fruits used in the analysis of total antioxidant activity (TAA) and total phenols (TPCs) were selected per replicate and in a homogeneous ripening stage one week after observing the color change of the fruits. One sample per replicate was taken, consisting of pieces of 10–15 fruits. After cutting, the fruits were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at −80 °C. Prior to analysis, all samples were freeze-dried to remove the water content for 72 h, yielding 6.8% dry matter. With 0.5 g of powdered sample, the measurement procedure for the two parameters, TAA and TPCs, was carried out.

Several methods should be used to determine the total antioxidant activity to better contrast the results obtained since each of them is based on a different determination route and can give different results from each other [37,38]. The direct determination methods used were DPPH (described by Brand-Williams et al. [39], with a modification in the reaction time) and ABTS (according to Re et al. [40]). For the determination of antioxidant activity, a methanolic extract was prepared from each sample to be analyzed. The freeze-dried fruits (0.5 g) were mixed with 5 mL of MeOH/water (80:20, v/v) + 1% HCl, sonicated at 20 °C for 15 min, and left for 24 h at 4 °C. The extract was then returned to the sample and mixed with 5 mL of MeOH/water (80:20, v/v) + 1% HCl. The extract was then sonicated again for 15 min and centrifuged at 15,000 rpm for 10 min. Calibration curves, in the range 0.01–5.00 mmol Trolox/kg, were used for the quantification of the three antioxidant activity methods and showed good linearity ($r^2 \geq 0.998$). The analyses were carried out in four replicates, and the results are expressed in mmol Trolox/kg dry matter.

Total phenols were determined using the Folin–Ciocalteu colorimetric method described by Singleton et al. [41], with some modifications. To a sample of the prepared extract (100 µL), 200 µL (1/10) of Folin–Ciocalteu reagent and 2 mL of distilled water were added and incubated for 3 min at room temperature. Then, 1 mL of sodium carbonate (20%, w/v) was added and incubated again for 1 h. Calibration curves, with a concentration range between 0 and 0.25 g GAE/L, were used for TPC quantification and showed good linearity ($r^2 \geq 0.996$). All determinations were performed in quadruplicate, and the results are expressed as milligrams of gallic acid equivalent per 100 g of dry matter sample (mg gallic acid eq/100 g dry matter).

Analyses were performed using a UV-vis spectrophotometer (Termospectromic Helios Gamma UVG 1002 E, Cambridge, UK). The absorbance was read at 765 nm for the quantification of total phenolic compounds and at 515 and 734 nm for the quantification of total antioxidant capacity by the DPPH and ABTS methods, respectively.

2.4. Statistical Analysis

Analyses of variance were performed according to the one-factor generalized linear model, with genotypes as a factor. Fisher's Least Significant Difference (LSD) procedure

was used for the discrimination of means with a confidence level of 95%. Statgraphics and Excel were used to interpret the results.

3. Results

The analysis of variance showed statistically significant differences in yield, mean weight, total soluble solids, and total acidity for each of the years. In terms of total antioxidant activity, differences were only found in 2022 in the DPPH method. In the case of total phenols, no differences were found in any of the years (Table 3 and Figures 1–3).

Table 3. *p*-values of the one-factor GML analyses of variance, with genotypes as a factor. Significance levels: ns (*p* > 0.05), * (*p* < 0.05), and *** (*p* < 0.001). The mean and groups obtained by Fisher’s LSD tests are included (values followed by the same letter are not significantly different at 5% level by Fisher). Units are in kg/plant for yield, g/fruit for mean weight, °Brix for total soluble solids, and % citric acid/100 g fresh tissue for titratable acidity. ABTS and DPPH are obtained in mmol Trolox/kg dry matter. Total polyphenol is in mg eq gallic acid/100 g dry matter.

Year		Yield	Fruit Weight	TSS	TA	TAA		TPCs
						ABTS	DPPH	
				GML Test				
2022	<i>p</i> -value	***	***	***	***	ns	*	ns
2023	<i>p</i> -value	***	***	*	***	ns	ns	ns
				Fisher’s Multiple Range Test				
2022	Genotype							
	175 RR rr	0.80 a	37.69 abc	6.05 d	0.37 b	21.70	10.46 a	860.4
	175 ss SS	2.05 c	45.06 de	5.92 cd	0.43 d	20.60	14.72 abc	814.1
	175 ss rr	1.36 b	33.50 a	5.73 bc	0.45 e	20.30	10.71 a	817.8
	175 RR SS	1.20 ab	36.50 ab	5.74 bc	0.32 a	19.70	13.73 ab	836.8
	220 RR rr	1.48 b	39.81 bcd	5.59 ab	0.30 a	22.60	12.63 ab	835.3
	220 ss SS	2.40 c	50.76 f	5.47 a	0.40 c	19.10	14.75 abc	807.2
	220 ss rr	2.02 c	42.85 cde	5.77 bc	0.40 c	21.40	15.91 bc	812.2
	220 RR SS	2.09 c	45.56 ef	5.47 a	0.31 a	20.30	18.27 c	850.0
2023	Genotype							
	175 RR rr	1.43 a	46.45 ab	5.09 abc	0.32 b	18.75	13.90	827.3
	175 ss SS	2.46 b	57.13 c	5.16 bc	0.40 d	17.10	15.30	769.2
	175 ss rr	1.63 a	48.08 ab	5.13 bc	0.29 a	20.18	11.64	821.6
	175 RR SS	1.53 a	43.59 a	4.99 ab	0.29 a	19.60	12.30	822.4
	220 RR rr	1.65 a	44.38 a	5.01 ab	0.28 a	20.70	12.10	841.1
	220 ss SS	3.08 c	59.00 c	5.11 bc	0.36 c	19.30	15.10	823.2
	220 ss rr	2.58 b	50.90 b	5.23 c	0.36 c	21.5	14.70	819.5
	220 RR SS	1.82 a	47.81 ab	4.90 a	0.30 a	20.10	11.50	796.4

3.1. Yield and Average Fruit Weight

The behavior of the yield curves and average fruit weight (Figure 1a,b) were similar in the two years, both for the UMH175 and UMH220 families. In the two parameters studied, the ssSS genotype was the most productive in each of the years and lines. In production, the rest of the genotypes of the UMH175 family, containing *Ty-1*, *ty-5*, or both, were included in the same group in the two years, although the results of the genotype that only contains *ty-5* (ssrr) were slightly higher. The same was true for the average fruit weight, with the exception of the ssrr genotype, where the results were lower in 2022. In the case of the UMH220 family, for the production in 2022 and 2023, there were differences between those that carried *Ty-1* (RRrr and RRSS) and those that did not (ssSS and ssrr), differentiating the genotype RRSS corresponding to the year 2022 that was grouped with the genotypes ssSS and ssrr. Comparing the genotypes without *Ty-1* (ssSS and ssrr), the former was more productive because it did not include any introgression. In mean fruit weight, the trend of the genotypes was similar to that of production. In this context, we consider that the trend of the means of the genotypes studied in these two productive traits, in each of the years

and lines, was slightly higher in the genotypes that did not contain *Ty-1* (ssSS and ssrr), although not in all cases.

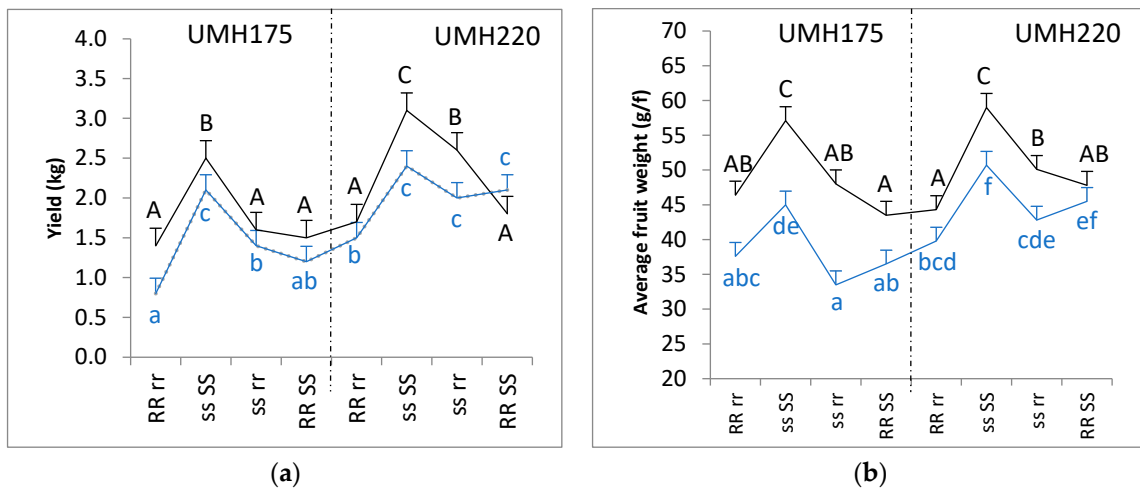


Figure 1. Discrimination of means according to Fisher's LSD test for yield (a) and average fruit weight (b) in the genotypes [RRrr (*Ty-1/ty-5*), ssSS (*ssSS*), ssrr (*ss/ty-5*), and RRSS (*Ty-1/SS*)] of the two families. The blue curve corresponds to 2022 (with lowercase letters), and the black curve to 2023 (with uppercase letters). Dashed lines separate the two families.

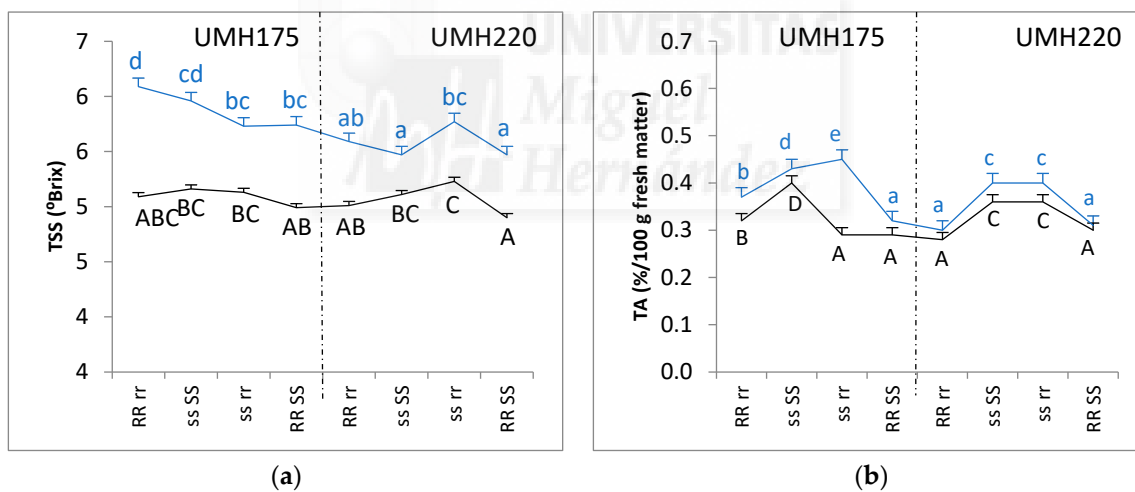


Figure 2. Discrimination of means according to the Fisher LSD test for total soluble solids (a) and titratable acidity (b) in the genotypes [RRrr (*Ty-1/ty-5*), ssSS (*ssSS*), ssrr (*ss/ty-5*), and RRSS (*Ty-1/SS*)] of the two families. The blue curve corresponds to 2022 (with lowercase letters), and the black curve to 2023 (with uppercase letters). Dashed lines separate the two families.

3.2. Total Soluble Solids and Titratable Acidity

In TSS (Figure 2a), the genotypes did not follow the established pattern in the productive parameters. The curves obtained in the two years were similar, except for genotype RRrr of line 175, which differed between the years, though the difference between the values with the rest of the genotypes was approximately 1 °Brix. Contrary to what occurred in TSS, the results obtained in TA (Figure 2b) showed the same pattern as in the productive traits, although in a clearer way. The genotypes of line 220 that did not contain *Ty-1* (ssSS and ssrr) were statistically different from the genotypes that did contain this allele (RRrr and RRSS), both in 2022 and 2023. The behavior of the genotypes in line 175 was the same in 2022. In 2023, the genotype containing only *ty-5* (ssrr) was included in the same group as the genotypes with *Ty-1* (RRrr and RRSS).

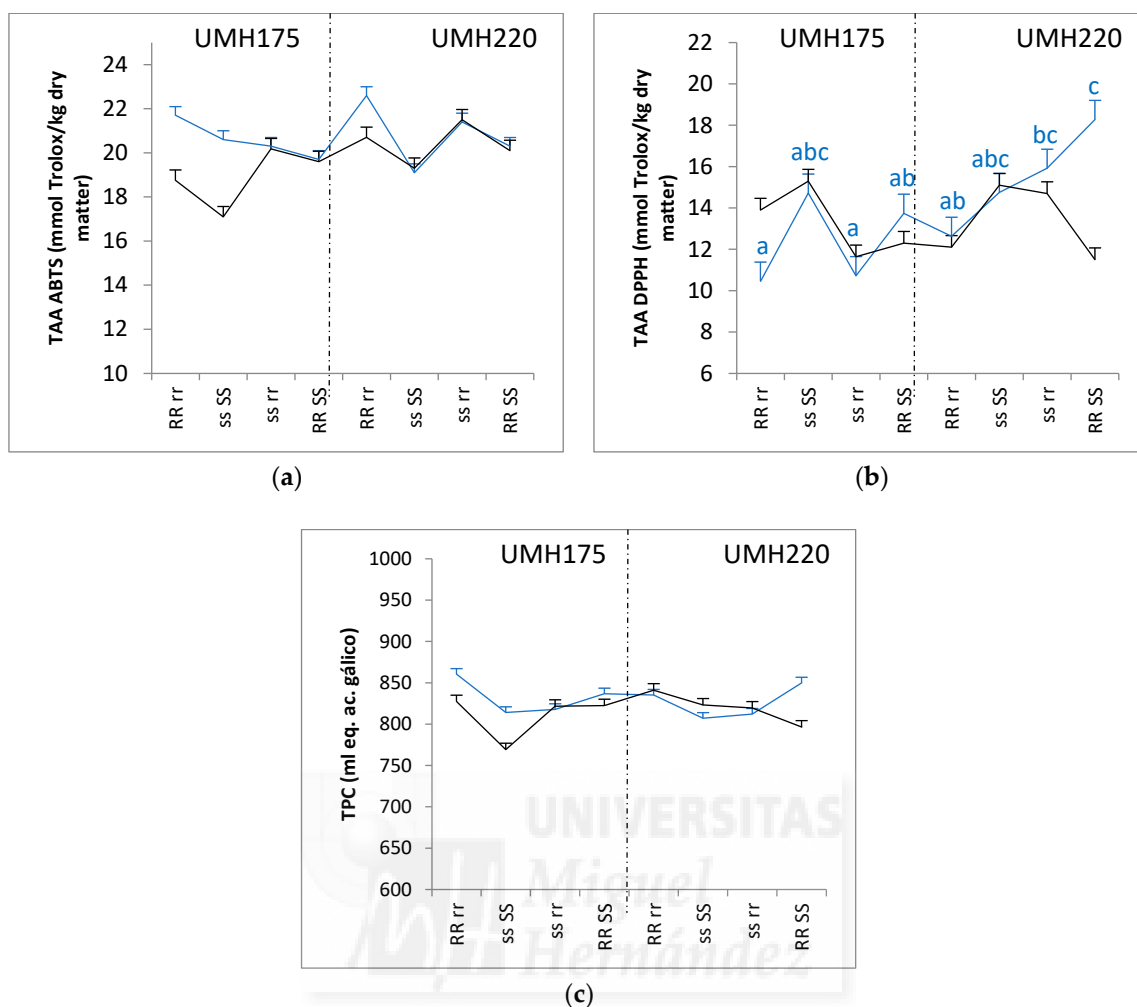


Figure 3. Discrimination of means according to the Fisher LSD test for total antioxidant activity (a,b) and total phenolic compounds (c) in the genotypes [RRrr (*Ty-1/ty-5*), ssSS (ssSS), ssrr (*ss/ty-5*), and RRSS (*Ty-1/SS*)] of the two families. The blue curve corresponds to 2022 (with lowercase letters), and the black curve to 2023. Dashed lines separate the two families.

3.3. Total Antioxidant Activity and Total Phenolic Compounds

TAA was analyzed using the ABTS and DPPH methods (Figure 3a,b). In the ABTS method, there were no differences in either of the two years. In the DPPH method, differences were present in 2022 between genotype 220 ssrr and genotypes RRrr and ssrr of line 175. In addition, there were differences between genotype RRSS of line 220 and genotype RRrr of the same line and all genotypes of line 175. In the case of total phenols (Figure 3c), it was observed that there were no differences between genotypes in each of the years.

4. Discussion

Several published papers have highlighted the negative effect of introducing resistance genes due to the genes themselves and/or the linkage load. Tanksley et al. [42] observed slight reductions in the yield and quality of tomatoes for processing with ToMV resistance. Lewis et al. [43] found a reduction in yield and quality in tobacco plants containing the N gene (from the wild species *Nicotiana glutinosa* L.), which confers resistance to TMV. Brouwer and St Clair [44] found that the chromosome fragment of the *S. hirsutum* species conferring resistance to *Phytophthora infestans* contained deleterious alleles in agronomically important traits. Verlaan et al. [32] showed that on a large part of chromosome six of *S. chilense* (where the *Ty-1* gene, which confers resistance to TYLCV, is located), recombination with cultivated tomato is very low due to two chromosomal rearrangements that occurred in

S. chilense. This would make it difficult to eliminate the chromosome of the wild species during backcrossing. To quantify the effect of the introduction of ToMV, TSWV, and TYLCV resistance genes on the yield and quality traits in Muchamiel and De la pera tomatoes, two sets of near-quasi-isogenic lines NIL containing all homozygous combinations for the three resistance genes were developed and evaluated for 3 years. The introduction of genetic resistance to TYLCV was found to produce a decrease in the main productive traits (yield, average weight) ranging from 10% to 50%, depending on the growing conditions and genetic background [31]. In this study, we report that the genotypes evaluated show that BC5S2 containing *Ty-1*, regardless of whether it contains *ty-5* or not (RRrr and RRSS), produces a negative effect on the production parameters analyzed, yield, and average fruit weight. The highest yields are found in the genotypes susceptible to both genes (ssSS), and in the absence of introgression, there is no negative effect. The BC5S2 of the UMH220 line containing only *ty-5* (ssrr) produces a slight negative effect since the results are more similar to those obtained by the susceptible genotype (ssSS). In the opposite case, the BC5S2 ssrr of the UMH175 line, the results are more similar to those obtained by the genotypes containing *Ty-1* (RRrr and RRSS). In a preliminary study carried out during the spring cycle of 2021 with the same lines, 175 and 220, although with a smaller number of plants, we concluded that the introgression of the *ty-5* gene did not produce a negative effect on production in the lines studied, unlike the *Ty-1* gene [45]. In this case, the results of the UMH175 line differ from those obtained in the preliminary study of 2021, although the results obtained by the UMH220 line are similar. In reference to the quality parameters, *Ty-1* introgression also has a negative effect on AT, while *ty-5* introgression does not, although this is clearer in the UMH220 line, in contrast to TSS, where introgressions are not decisive in any case. These results are similar to those obtained by Rubio et al. [31], who, in addition to yield, studied these two parameters, where the effect of *Ty-1* introgression was not decisive for TSS but was for TA. For total antioxidant activity, both for the ABTS and DPPH methods and for total phenols, the mean values obtained (taking into account the 6.8% dry matter obtained) are similar to those shown by Lipan et al. in 2021 [46]. These authors studied a cherry tomato variety by applying deficit irrigation (RDI), where a saving of 53% of water with the RDI of tomatoes presented, in general, a greater weight, size, TSS, sugars, antioxidant activity, lycopene, β -Carotene, and redder color with a more intense tomato flavor. We demonstrate that neither *Ty-1* nor *ty-5* introgression is a determinant. Although differences can be observed between some genotypes in 2022 for the DPPH method, when comparing the genotypes of the UMH175 family with each other, there are no differences, while when comparing those of the UMH220 family, the differences are only observed between the RRrr and RRSS genotypes.

5. Conclusions

Based on the results obtained in this study and taking into account the behavior of the genotypes of preliminary studies, we conclude that the introgression of the *ty-5* allele produces a slightly negative effect on yield, average fruit weight, total soluble solids, and total acidity. This is in contrast to *Ty-1*, which produces a large negative effect. In terms of total antioxidant activity and total phenols, the introgression of both the *Ty-1* and *ty-5* genes in the De la pera breeding lines studied does not produce a negative effect, as all the genotypes behave in a similar way to the susceptible genotype (ssSS) for both genes. *ty-5* is a promising gene for use in breeding programs, as it shows only a slight negative effect in introgression, as well as offering a high level of resistance, further accentuated in combination with *Ty-1* (data to be published). The data obtained from other preliminary studies (data to be published) with the same lines and combinations of *Ty-1* and *ty-5*, but recombinant to *Ty-1*, also showed good resistance behavior, so the results are promising.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/agriculture14071192/s1>, Supplementary Figure S1. Greenhouse located at the Escuela Politécnica Superior de Orihuela (EPSO-UMH), Orihuela, Spain (38.06782;

–0.98232). Figure S2. Initial crop development in 2022. Figure S3. Advanced crop development in 2022. Figure S4. Plants at an advanced stage of cultivation in 2023.

Author Contributions: Conceptualization, J.Á.C., J.J.R. and S.G.-M.; methodology, J.Á.C., P.C., J.F.S., A.G., F.H. and A.A.; software, J.Á.C.; formal analysis, J.Á.C. and F.H.; data curation, J.Á.C. and S.G.-M.; writing—original draft preparation, J.Á.C.; writing—review and editing, J.Á.C., J.J.R. and S.G.-M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: J.Á.C. has the FPU18/01399 contract of the “Programa estatal de promoción del talento y su empleabilidad, Subprograma de Formación de Profesorado Universitario (FPU)”, of the Ministry of Universities of Spain.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are available upon request from the authors.

Acknowledgments: The authors thank Javier Vives Solbes for his technical support in the laboratory.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

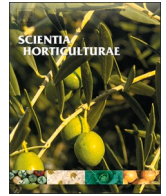
- Shahriari, Z.; Su, X.; Zheng, K.; Zhang, Z. Advances and Prospects of Virus-Resistant Breeding in Tomatoes. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 15448. [[CrossRef](#)]
- Anbinder, I.; Reuveni, M.; Azari, R.; Paran, I.; Nahon, S.; Shlomo, H.; Chen, L.; Lapidot, M.; Levin, I. Molecular dissection of Tomato leaf curl virus resistance in tomato line TY172 derived from *Solanum peruvianum*. *Theor. Appl. Genet.* **2009**, *119*, 519–530. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Vasudeva, R.S.; Sam Raj, J. A leaf curl disease of tomato. *Phytopathology* **1948**, *38*, 364–369.
- Cohen, S.; Harpaz, I. Periodic, rather than continual acquisition of new tomato virus by its vector, the tobacco whitefly (*Bemisia tabaci* Gennadius). *Entomol. Exp. Appl.* **1964**, *7*, 155–166. [[CrossRef](#)]
- Picó, B.; Díez, M.J.; Nuez, F. Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. The Tomato yellow leaf curl virus—A review. *Sci. Hortic.* **1996**, *67*, 151–196. [[CrossRef](#)]
- Moriones, E.; Arnó, J.; Accotto, G.P.; Noris, E.; Cavallarin, L. First report of Tomato yellow leaf curl virus in Spain. *Plant Dis.* **1993**, *77*, 953. [[CrossRef](#)]
- Reina, J.; Jiménez, J.; Bejarano, E.R.; Guerra, J.M.; Cuadrado, I.M.; García, C. El virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV). *Hortofruticultura* **1994**, *6*, 36–40.
- Navas-Castillo, J.; Sanchez-Campos, S.; Díaz, J.A.; Sáez-Alonso, E.; Moriones, E. First report of Tomato yellow leaf curl virus-Is in Spain: Coexistence of two different geminiviruses in the same epidemic outbreak. *Plant Dis.* **1997**, *81*, 1461. [[CrossRef](#)]
- Pilowsky, M.; Cohen, S. Tolerance to Tomato yellow leaf curl virus derived from *L. peruvianum*. *Plant Dis.* **1990**, *74*, 248–250. [[CrossRef](#)]
- Friedmann, M.; Lapidot, M.; Cohen, S.; Pilowsky, M. A novel source of resistance to Tomato yellow leaf curl virus exhibiting a symptomless reaction to viral infection. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **1998**, *123*, 1004–1007. [[CrossRef](#)]
- Kaloo, G.; Banerjee, M.K. Transfer of Tomato leaf curl virus resistance from *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum* to *L. esculentum*. *Plant Breed.* **1990**, *105*, 156–159. [[CrossRef](#)]
- Kasrawi, M.A.; Suwwan, M.A.; Mansour, A. Sources of resistance to Tomato-yellow-leaf-curl-virus (TYLCV) in *Lycopersicon* species. *Euphytica* **1988**, *37*, 61–64. [[CrossRef](#)]
- Laterrot, H. Resistance genitors to Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV). *Tomato Leaf Curl. Nswl.* **1992**, *1*, 2–4.
- Scott, J.W.; Stevens, M.R.; Barten, J.H.M.; Thome, C.R.; Polston, J.E.; Schuster, D.J.; Serra, C.A. Introgression of resistance to whitefly-transmitted geminiviruses from *Lycopersicon chilense* to tomato. In *Bemisia: 1995 Taxonomy, Biology, Damage, Control and Management*; Gerling, D., Mayer, R.T., Eds.; Intercept Ltd.: Andover, UK, 1995; pp. 357–367.
- Vidavsky, F.; Czosnek, H. Tomato breeding lines resistant and tolerant to tomato yellow leaf curl virus issued from *Lycopersicon hirsutum*. *Phytopathology* **1998**, *88*, 910–914. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zamir, D.; Michelson, I.E.; Zakay, Y.; Navot, N.; Zeidan, M.; Sarfatti, M.; Eshed, Y.; Harel, E.; Pleban, T.; van Oss, H.; et al. Mapping and introgression of a tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, *Ty-1*. *Theor. Appl. Genet.* **1994**, *88*, 141–146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hanson, P.M.; Bernacchi, D.; Green, S.; Tanksley, S.D.; Muniyappa, V.; Padmaja, A.S.; Chen, H.; Kuo, G.; Fang, D.; Chen, J. Mapping a Wild Tomato Introgression Associated with Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistance in a Cultivated Tomato Line. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **2000**, *125*, 15–20. [[CrossRef](#)]
- Dueñas, F.; Martínez, Y.; Álvarez, M.; Moya, C.; Peteira, B.; Arias, Y.; Díez, M.J.; Hanson, P.; Shagarodsky, T. Caracterización agromorfológica y evaluación de la resistencia al TYLCV en nuevos genotipos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) como apoyo al programa de mejoramiento genético de la hortaliza para la enfermedad. *Cultiv. Trop.* **2008**, *29*, 53–60.
- Hanson, P.M.; Green, S.K.; Kuo, G. *Ty-2*, a gene on chromosome 11 conditioning geminivirus resistance in tomato. In *Report of the Tomato Genetics Cooperative*; Scott, J.W., Ed.; University of Florida: Wimauma, FL, USA, 2006; Volume 56, pp. 17–18.

20. Ji, Y.; Scott, J.W.; Hanson, P.; Graham, E.; Maxwell, D.P. Sources of resistance, inheritance, and location of genetic loci conferring resistance to members of the tomatoinfecting begomoviruses. In *Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease: Management, Molecular Biology, Breeding for Resistance*; Henryk, C., Ed.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2007; pp. 343–362.
21. Ji, Y.; Schuster, D.J.; Scott, J.W. *Ty-3*, a begomovirus resistance locus near the *Tomato yellow leaf curl virus* resistance locus *Ty-1* on chromosome 6 of tomato. *Mol. Breed.* **2007**, *20*, 271–284. [[CrossRef](#)]
22. Verlaan, M.G.; Hutton, S.F.; Ibrahim, R.M.; Kormelink, R.; Visser, R.G.; Scott, J.W.; Edwards, J.D.; Bai, Y. The Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistance Genes *Ty-1* and *Ty-3* are Allelic and Code for DFDGD-Class RNA-Dependent RNA Polymerases. *PLoS Genet.* **2013**, *9*, e1003399. [[CrossRef](#)]
23. Ji, Y.; Scott, J.W.; Schuster, D.J. Toward Fine Mapping of the Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistance Gene *Ty-2* on Chromosome 11 of Tomato. *HortScience* **2009**, *44*, 614–618. [[CrossRef](#)]
24. Hutton, S.F.; Scott, J.W.; Schuster, D.J. Recessive Resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* from the Tomato Cultivar Tyking Is Located in the Same Region as *Ty-5* on Chromosome 4. *HortScience* **2012**, *47*, 324–327. [[CrossRef](#)]
25. Lapidot, M.; Karniel, U.; Gelbart, D.; Fogel, D.; Evenor, D.; Kutsher, Y.; Makhbash, Z.; Nahon, S.; Shlomo, H.; Chen, L.; et al. A Novel Route Controlling Begomovirus Resistance by the Messenger RNA Surveillance Factor Pelota. *PLoS Genet.* **2015**, *11*, e1005538. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Hutton, S.F.; Scott, J.W. *Ty-6*, a major begomovirus resistance gene located on chromosome 10. In *Report of the Tomato Genetics Cooperative*; Scott, J.W., Ed.; University of Florida: Wimauma, FL, USA, 2014; Volume 64, pp. 14–18.
27. Scott, J.W.; Hutton, S.F.; Freeman, J.H. Fla. 8638B and Fla. 8624 Tomato Breeding Lines with Begomovirus Resistance Genes *ty-5* Plus *Ty-6* and *Ty-6*, respectively. *HortScience* **2015**, *50*, 1405–1407. [[CrossRef](#)]
28. Prasanna, H.C.; Sinha, D.P.; Rai, G.K.; Krishna, R.; Kashyap, S.P.; Singh, N.K.; Singh, M.; Malathi, V.G. Pyramiding *Ty-2* and *Ty-3* genes for resistance to monopartite and bipartite tomato leaf curl viruses of India. *Plant Pathol.* **2014**, *64*, 256–264. [[CrossRef](#)]
29. Elbaz, M.; Hanson, P.; Fgaier, S.; Laarif, A. Evaluation of tomato entries with different combinations of resistance genes to tomato yellow leaf curl disease in Tunisia. *Plant Breed.* **2016**, *135*, 525–530. [[CrossRef](#)]
30. Al-Shihi, A.A.; Peter, H.; Al-Sadi, A.M.; Al-Yahyai, R.A.; Briddon, R.W.; Deadman, M.; Shahid, M.S. Evaluation of tomato inbred lines for resistance to the tomato yellow leaf curl disease complex in Oman. *Crop Prot.* **2018**, *110*, 91–98. [[CrossRef](#)]
31. Rubio, F.; Alonso, A.; García-Martínez, S.; Ruiz, J.J. Introgression of virus-resistance genes into traditional tomato varieties (*Solanum lycopersicum* L.): Effects on yield and quality. *Sci. Hortic.* **2016**, *198*, 183–190. [[CrossRef](#)]
32. Verlaan, M.G.; Szinay, D.; Hutton, S.F.; de Jong, H.; Visser, R.G.F.; Scott, J.W.; Bai, Y. Chromosomal rearrangements between tomato and *Solanum chilense* hamper mapping and breeding of the TYLCV resistance gene *Ty-1*. *Plant J.* **2011**, *68*, 1093–1103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Cabrera, J.A.; Carbonell, P.; Salinas, J.F.; Alonso, A.; Grau, A.; Ruiz, J.J.; García-Martínez, S. Diseño de marcadores moleculares ligados al gen *Ty-1* para la búsqueda de individuos recombinantes que hayan perdido parte de la carga de ligamiento asociada al gen *Ty-1*. In *Libro de Resúmenes del III Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria*; LIMENCOP: Orihuela, Spain, 2022.
34. García-Martínez, S.; Grau, A.; Alonso, A.; Rubio, F.; Valero, M.; Ruiz, J. UMH 1203, a Multiple Virus-resistant Fresh-market Tomato Breeding Line for Open-field Conditions. *HortScience* **2012**, *47*, 124–125. [[CrossRef](#)]
35. Perez de Castro, A.; Blanca, J.M.; Díez, M.J.; Nuez Viñals, F. Identification of a CAPS marker tightly linked to the Tomato yellow leaf curl disease resistance gene *Ty-1* in tomato. *Eur. J. Plant Pathol.* **2007**, *117*, 347–356. [[CrossRef](#)]
36. García-Martínez, S.; Sánchez, C.; Castelló, J.; Grau, A.; Valero, M.; Ferrández, A.; Ruiz, J.J. Empleo de marcadores moleculares para la introducción múltiple de genes de resistencia a virosis (ToMV, TSWV y TYLCV) en variedades tradicionales de tomate alicantinas. *Agrícola Vergel.* **2003**, *255*, 140–143.
37. Robles-Sánchez, R.M.; Rojas-Graü, M.A.; Odriozola-Serrano, I.; González-Aguilar, G.A.; Martín-Belloso, O. Effect of minimal processing on bioactive compounds and antioxidant activity of fresh-cut ‘Kent’ mango (*Mangifera indica* L.). *Postharvest Biol. Technol.* **2009**, *51*, 384–390. [[CrossRef](#)]
38. Tabart, J.; Kevers, C.; Pincemail, J.; Defraigne, J.O.; Dommes, J. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chem.* **2009**, *113*, 1226–1233. [[CrossRef](#)]
39. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Sci. Technol.* **1995**, *28*, 25–30. [[CrossRef](#)]
40. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Singleton, V.L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* **1999**, *299*, 152–178. [[CrossRef](#)]
42. Tanksley, S.D.; Bernachi, D.; Emmatty, D.; Eshed, Y.; Inai, S.; Lopez, J.; Petiard, V.; Sayama, H.; Uhlig, J.; Zamir, D. Yield and quality evaluation on a pair of processing tomato lines nearly isogenic for the *Tm2a* gene for resistance to the tobacco mosaic virus. *Euphytica* **1998**, *99*, 77–83. [[CrossRef](#)]
43. Lewis, R.S.; Linger, L.R.; Wolff, M.F.; Wernsman, E.A. The negative influence of N-mediated TMV resistance on yield in tobacco: Linkage drag versus pleiotropy. *Theor. Appl. Genet.* **2007**, *115*, 169–178. [[CrossRef](#)]
44. Brouwer, D.J.; St Clair, D.A. Fine mapping of three quantitative trait loci for late blight resistance in tomato using near isogenic lines (NILs) and sub-NILs. *Theor. Appl. Genet.* **2004**, *108*, 628–638. [[CrossRef](#)]

45. Cabrera, J.A.; Carbonell, P.; Salinas, J.F.; Alonso, A.; Grau, A.; García-Martínez, S.; Pérez de Castro, A.; Díez, M.J.; Ruiz, J.J. Estudio preliminar de la resistencia al virus del rizado amarillo del tomate en líneas de mejora de tomate De la pera. In *Libro de Resúmenes del IX Congreso Ibérico y XVII Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas*; SECH: Mérida, Spain, 2023.
46. Lipan, L.; Issa-Issa, H.; Moriana, A.; Zurita, N.M.; Galindo, A.; Martín-Palomo, M.J.; Andreu, L.; Carbonell-Barrachina, Á.A.; Hernández, F.; Corell, M. Scheduling Regulated Deficit Irrigation with Leaf Water Potential of Cherry Tomato in Greenhouse and its Effect on Fruit Quality. *Agriculture* **2021**, *11*, 669. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.





Research Paper

Assessment of resistance of *Ty-1* and *ty-5* genes in *Solanum lycopersicum* plants infected with tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)

José Ángel Cabrera^a, Pedro Carbonell^a, Aranzazu Alonso^a, Clara Pérez-Moro^b, Ana Pérez de Castro^b, Juan José Ruiz^a, Santiago García-Martínez^{a,*}

^a Instituto de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental (CIAGRO-UMH), Universidad Miguel Hernández, ctra. de Beniel km 3.2, 03312, Orihuela, Alicante, Spain

^b Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV), Camino de Vera s/n, 46022, Valencia, Spain



ARTICLE INFO

Keywords:

Pyramiding
Traditional
Muchamiel
De la pera
Breeding line
Begomovirus genus
Inoculation

ABSTRACT

A group of viruses within the *Begomovirus* genus is responsible for tomato yellow leaf curl virus disease (TYLCVD). The genus *Begomovirus* belongs to the family *Geminiviridae*, which is divided into 14 genera. TYLCV is a virus that since its emergence in 1939 continues to severely affect tomato crops worldwide, partly due to its ease of recombination and emergence of new mutations. The virus is transmitted by the whitefly (*Bemisia tabaci*), and since measures to control *B. tabaci* populations are not fully effective and there is always a risk of infection, the best defence mechanism is genetic resistance. Two sets of breeding lines with different homozygous combinations of the *Ty-1* and *ty-5* genes (*Ty-1* lines, *ty-5* lines, *Ty-1/ty-5* lines and susceptible lines) were studied. A priori, this is the first study of TYLCV inoculation under controlled conditions in lines carrying the *Ty-1* and *ty-5* genes. The aim of the study was to evaluate the behaviour of tomato breeding lines carrying these two genes and test their level of tolerance to TYLCV. All plants showed a homogeneous response depending on the genotype studied. The results of the breeding lines studied with all homozygous combinations of the *Ty-1* and *ty-5* genes were consistent with those of the controls. Susceptible genotypes (ss/SS) showed severe symptoms and high viral accumulation, and resistant genotypes (*Ty-1/ty-5*, *ty-5* and *Ty-1*) showed very mild symptoms and low viral accumulation. The phenotypic responses to TYLCV can be classified into two groups: the susceptible genotypes (ss/SS) for the two genes and the resistant genotypes (*Ty-1*, *ty-5* and *Ty-1/ty-5*), presenting *Ty-1*, *ty-5* or both. In this study, we have demonstrated that both *Ty-1* and *ty-5*, whether used together or individually, provide a similarly high level of resistance.

1. Introduction

Most viruses infecting plants (80–90%) have single-stranded RNA as their genetic component, while the remaining plant pathogenic viruses contain DNA as their genome (Rojas, 2000). The *Geminiviridae* family of viruses has a DNA genome, composed of one or two small circular, single-stranded molecules (DNA-A and DNA-B), approximately 2.5 to 3.0 kb each. With a total genome size ranging from 2.5–5.0 kb, geminiviruses are among the smallest viruses with independently replicating genomes and are among the only DNA viruses with a split genome (Rojas, 2000). Based on host range, type of insect vector, genome organization, and phylogenetic relationships, the *Geminiviridae* family is divided into fourteen genera: *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Capulavirus*, *Citlodavirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Grabovirus*, *Maldovirus*, *Mastrevirus*,

Mulcrilevirus, *Opunvirus*, *Topocovirus*, *Turncurtovirus* and *Topilevirus*. There are 520 species in the *Geminiviridae* family. Among these species, 445 belong to the genus *Begomovirus*, which is the largest in the entire virosphere (Silva et al., 2023). A group of viruses within the *Begomovirus* genus is responsible for tomato yellow leaf curl virus disease (TYLCVD) (Picó et al., 1996). *Begomoviruses* possess one or two circular single-stranded DNA (ssDNA) genome(s), each about 2.7–2.8 kb in size. TYLCV and most TYLCV-like *begomoviruses* have monopartite genomes consisting of one ssDNA molecule, except for tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus (TYLCKaV) and tomato yellow leaf curl Thailand virus (TYLCTHV). These two *begomoviruses* are bipartite, with a genome containing two ssDNA molecules—DNA-A and DNA-B (Yan et al., 2021). TYLCV has great potential to change due to factors such as mutation and genetic recombination, enabling rapid adaptation of the

* Corresponding author.

E-mail address: sgarcia@umh.es (S. García-Martínez).

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2025.114012>

Received 11 October 2024; Received in revised form 27 January 2025; Accepted 6 February 2025

Available online 16 February 2025

0304-4238/© 2025 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

TYLCV complex to ever-changing environmental conditions (Navas-Castillo et al., 2011; Yan et al., 2021). A high degree of intra- and inter-species recombination has been observed within the TYLCV complex and among begomoviruses (Abhary et al., 2007; Yan et al., 2021). For example, TYLCV-IL is the result of recombination between TYLCV-Mld and tomato leaf curl Karnataka virus (ToLCKV), while the Sardinia strain (TYLCSV) likely emerged from a South African cassava mosaic virus (SACMV) ancestor by genetic exchange through recombination. Co-infection of tomato plants with TYLCV and TYLCSV led to the emergence of two recombinant viruses associated with TYLCD — TYLCMaV and TYLCAxV — which have acquired a broader host range than any of the parents. Moreover, a new virus strain, TYLCV-IS76, has emerged due to a recombination event between TYLCV-IL and the Spanish strain of TYLCSV (TYLCSV-ES). TYLCV-IL [IT: Sic23:16] and TYLCV-IL-[IT: Sar IS141:16] originated from the genetic exchange of parental strains TYLCV and TYLCSV (Yan et al., 2021).

The disease is transmitted via the tobacco whitefly, *Bemisia tabaci* Gennadius, (Cohen and Harpaz, 1964). Symptoms include dwarfism, upward leaf puckering, vein clearing, and excessive branching and stunting, all associated with mild to severe mosaic symptoms and partial or total plant sterility (Vasudeva and Sam Raj, 1948). The virus infects dicotyledons, mainly Solanaceae, and causes serious problems in tomato crops in tropical and subtropical regions around the world, and has even been known to wipe out entire harvests (Picó et al., 1996; Rojas et al., 2005; Wang et al., 2018; Kill et al., 2021). The first evidence of economic damage to vegetable crops caused by *B. tabaci* was recorded in 1931 in Israel. A TYLCV-like disease was first reported in Israel in 1939–1940 and was associated with outbreaks of *B. tabaci* in the Jordan and Bet She'an Valleys; the entire tomato crop was completely destroyed (Cohen and Antignus, 1994). In Spain, the virus was first detected in 1992 in greenhouses in Murcia (Moriones et al., 1993) and Almería (Reina et al., 1994). It belonged to the species from Sardinia (tomato yellow leaf curl Sardinia virus, TYLCSV). Isolates of the TYLCV-Sr and TYLCV-IL species (renamed TYLCSV and TYLCV respectively; Fauquet et al., 2000) were found to be involved in TYLCV epidemics in these same regions (Sánchez-Campos et al., 1999). Five years later, following more severe episodes, the presence of the tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) species was detected in 1997 (Navas-Castillo et al., 1997). TYLCV-IL is probably the most widespread strain worldwide (Lefeuve et al., 2010). The high prevalence of TYLCV-IL in southern and southeastern Spain is due to the progressive displacement of TYLCV-Sr. This may be attributed to two main factors. Firstly, TYLCV-IL is more efficiently transmitted by local *B. tabaci* biotypes. Secondly, the common bean, which serves as a bridge crop between tomato crops, acts as a host for TYLCV-IL but not TYLCV-Sr. This suggests that the common bean serves as a reservoir for TYLCV-IL (Sánchez-Campos et al., 1999). Currently, TYLCV continues to hinder the cultivation of both commercial and traditional varieties. Since preventive and control measures against *Bemisia tabaci* populations are not fully effective, genetic resistance is the best long-term strategy for managing the disease. In fact, genetic resistance is emerging as the best strategy for controlling viral diseases in general due to an increasingly demanding international market and a growing

emphasis on environmental sustainability (Cabrera et al., 2024).

To date, six TYLCV tolerance loci have been identified. Zamir et al. (1994) found *Ty-1* on chromosome six of *S. chilense* accession LA1969. *Ty-2*, derived from *S. habrochaites*, was later mapped to chromosome 11 (Hanson et al., 2000; Hanson et al., 2006). *Ty-3* was located on chromosome six of *S. chilense* accessions LA1932 and LA2779 (Ji et al., 2007) near the *Ty-1* locus, suggesting a genetic link between *Ty-1* and *Ty-3* (Ji et al., 2007a). In 2013, Verlaan et al. (2013) accurately mapped *Ty-1* and *Ty-3*, concluding that the *Ty-3*-assigned region of approximately 71 kb overlapped with the *Ty-1*-containing region. The *Ty-4* gene was also mapped in *S. chilense* accession LA1932, but on chromosome three (Ji et al., 2009). Later, in another study designed to map the loci controlling TYLCV resistance in TY172, researchers identified a recessive QTL called *Ty-5* near the *SINAC1* marker on chromosome four (Friedmann et al., 1998; Anbinder et al., 2009). The University of Florida's tomato breeding programme has developed numerous breeding lines with Begomovirus resistance derived from Tyking, a hybrid bred by Royal Sluis (Enkhuizen, Netherlands). Molecular-marker-assisted analysis confirmed that the TYLCV resistance offered by Tyking was not controlled by the *Ty-1*, *Ty-2*, *Ty-3*, and *Ty-4* genes, and several of these lines were consequently tested with the *Ty-5* CAPS marker, *SINAC1*. The results showed that the Tyking-derived allele was recessive, so the authors proposed renaming the TY172-derived locus to *ty-5* to better reflect the recessive gene action. Tyking-associated resistance likely corresponds to that of TY172, although further evidence is needed to demonstrate the allelism of the genes (Hutton et al., 2012). In 2015, Lapidot et al. delimited the *ty-5* locus in a single gene encoding the tomato homolog of the messenger RNA surveillance factor Peló. By analysing a Fla.8638B X Fla.7987 F2 population, Hutton and Scott (2014) confirmed the effect of a *Begomovirus* tolerance gene on chromosome ten, named *Ty-6*. *Ty-1* is used in breeding programmes worldwide as it confers a high level of tolerance, although it does not show complete resistance, and under conditions of heavy infection, most cultivars end up expressing symptoms (Pérez de Castro, 2007). With molecular-marker-assisted pyramiding, it is possible to obtain plant materials that provide more effective and longer-lasting resistance over time, facilitating the management of traditional and commercial varieties, both outdoors and in greenhouses (Cabrera et al., 2024). Some authors have demonstrated the behaviour of these genes against TYLCV, both individually and in combination (Pérez de Castro et al., 2008; Ozores-Hampton et al., 2013; Prasanna et al., 2014; Scott et al., 2015; Elbaz et al., 2016; Al-Shihi et al., 2018; Wang et al., 2018; Yan et al., 2018; Ren et al., 2022; Ahmed et al., 2023).

In 1998, a breeding programme was launched at the Miguel Hernández University (CIAGRO-UMH) to develop traditional tomato varieties, Muchamiel and De la Pera, with resistance to the three main viruses affecting tomato cultivation (ToMV, TSWV and TYLCV). The goal was to develop pure lines that could be used by farmers to obtain seed throughout each crop cycle or serve as parental lines for the breeding programme. In 2017, introgression of the *ty-5* allele started to complement the previously introduced *Ty-1* resistance.

A priori, this is the first study of TYLCV inoculation under controlled

Table 1
Genotypes of the breeding lines used in this work.

Study 1		Study 2		Study 3	
Muchamiel	De la pera	Muchamiel	De la pera	Muchamiel	De la pera
<i>Ty-1</i> ^a	<i>ty-5</i> ^a	<i>Ty-1</i> ^a	ss/SS ^a	<i>Ty-1/ty-5</i> ^a	<i>Ty-1/ty-5</i> ^a
Control ss/SS ^c	ss/SS ^a	<i>ty-5</i> ^a	Control ss/SS ^c	ss/SS ^a	ss/SS ^a
Control <i>ty-5</i> ^b	Control ss/SS ^c	Control ss/SS ^c	Control <i>ty-5</i> ^b	<i>ty-5</i> ^a	<i>ty-5</i> ^a
	Control <i>ty-5</i> ^b	Control <i>ty-5</i> ^b		<i>Ty-1</i> ^a	<i>Ty-1</i> ^a
				Control <i>Ty-1</i> ^b	Control <i>Ty-1</i> ^b
				Control ss/SS ^c	Control ss/SS ^c
				Control <i>ty-5</i> ^b	Control <i>ty-5</i> ^b

^aControl *ty-5*: donor parent (line TX 468-RG on loan from Dr. Rafael Fernández-Muñoz del IHSM La Mayora-CSIC). ^aBC5S1 breeding lines (contain the *Tm-2*^a and *Sw-5* alleles in the homozygous state). ^bBreeding line with only *Ty-1* or *ty-5* genes. ^cTraditional cultivars.

Table 2Symptom severity (mean of the assessed plants) after inoculation of the genotypes of each evaluation according to the scale proposed by [Friedmann et al. \(1998\)](#).

Muchamiel	plants evaluated	mean severity index (0–4)				De la pera	plants evaluated	mean severity index (0–4)			
		7 dpi	14 dpi	21 dpi	28 dpi			7 dpi	14 dpi	21 dpi	28 dpi
Genotypes study 1											
<i>Ty-1</i> ^a	6	0.00	0.25	0.00	0.00	<i>ty-5</i> ^a	12	0.04	0.75	1.17	1.29
Control ss/SS ^c	10	0.60	1.50	3.80	3.90	Control ss/SS ^c	18	0.53	3.39	4.00	4.00
Control <i>ty-5</i> ^b	23	0.5	0.35	0.43	0.50	ss/SS ^a	8	0.31	1.63	4.00	3.88
						Control <i>ty-5</i> ^b	23	0.50	0.35	0.43	0.50
Genotypes study 2		7 dpi	14 dpi	21 dpi	28 dpi			7 dpi	14 dpi	21 dpi	28 dpi
<i>Ty-1</i> ^a	12	0.00	0.04	0.00	0.00	Control ss/SS ^c	16	0.31	3.38	3.75	3.94
Control ss/SS ^c	19	0.21	3.68	3.95	4.00	ss/SS ^a	18	0.45	3.33	3.68	3.67
<i>ty-5</i> ^a	20	0.00	0.55	0.00	0.00	Control <i>ty-5</i> ^b	16	0.00	0.59	0.16	0.34
Control <i>ty-5</i> ^b	16	0.00	0.59	0.16	0.34						
Genotypes study 3		-	15 dpi	24 dpi	30 dpi			-	15 dpi	24 dpi	30 dpi
<i>Ty-1/ty-5</i> ^a	10	-	0.00	0.00	0.00	<i>Ty-1/ty-5</i> ^a	9	-	0.00	0.00	0.00
ss/SS ^a	10	-	0.15	1.80	4.00	ss/SS ^a	10	-	1.75	2.90	4.00
<i>ty-5</i> ^a	10	-	0.00	0.45	0.40	<i>ty-5</i> ^a	8	-	0.25	0.13	0.50
<i>Ty-1</i> ^a	10	-	0.00	0.35	0.20	<i>Ty-1</i> ^a	8	-	0.00	0.00	0.13
Control <i>Ty-1</i> ^b	10	-	0.00	0.00	0.30	Control <i>Ty-1</i> ^b	9	-	0.00	0.50	0.39
Control ss/SS ^c	8	-	1.06	2.69	4.00	Control ss/SS ^c	10	-	0.95	3.80	4.00
Control <i>ty-5</i> ^b	10	-	0.00	0.10	0.35	Control <i>ty-5</i> ^b	10	-	0.00	0.10	0.35

dpi: days post-inoculation. ^aControl *ty-5*: donor parent (line TX 468-RG). ^aBC5S1 breeding lines (containing the *Tm-2*^a and *Sw-5* alleles in the homozygous state). ^bBreeding line with only *Ty-1* or *ty-5* genes. ^cTraditional cultivars.

conditions in lines carrying the *Ty-1* and *ty-5* genes. The aim of the study was to evaluate the behaviour of tomato breeding lines carrying these two genes and test their level of tolerance to TYLCV.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Local tomato varieties Muchamiel and De la pera are very popular in the Vega Baja del Segura region in southeastern Spain due to the exceptional organoleptic quality of their fruits. Muchamiel fruits have a melting texture and mild flavour, are large in size (180 g to 300 g), flattened, and strongly ribbed ([García-Martínez et al., 2011](#)). De la pera fruits have a juicy and firm texture, a high proportion of seeds and mucilage, and an intense flavour. The weight of the latter ranges from 75 to 125 g, while the shape varies from elongated oval to bell-shaped, with dark green shoulders and no ribs ([García-Martínez et al., 2012](#)). In this study, we conducted three experiments (studies 1 and 2 include symptom severity and study 3 includes symptom severity and viral load accumulation) using several Muchamiel and De la pera breeding lines obtained in the CIAGRO-UMH tomato breeding programme. We studied breeding lines with all homozygous combinations of the *Ty-1* and *ty-5* genes. Obtained after five backcrosses and two selfings, these lines also contain the *Tm-2*^a and *Sw-5* alleles (confer resistance to tomato mosaic virus (ToMV) and tomato spotted wilt virus (TSWV) respectively) in the homozygous state. Breeding lines with *Ty-1* or *ty-5* genes only and traditional cultivars were used as controls ([Table 1](#)). The genotypes of three plants per line were verified using the molecular markers linked to each gene, as described in [Carbonell et al. \(2018\)](#).

2.2. Inoculation

Inoculation was carried out using the agroinoculation method ([Kheyri-Pour et al., 1994](#)). The *Agrobacterium tumefaciens* used was transformed with a partial dimeric copy of the TYLCV-IL strain (provided by Dr. Eduardo Rodríguez-Bejarano, University of Málaga). The bacteria were cultivated for 48 h at 26 °C and in the dark in LB Broth medium, supplemented with kanamycin (100 mg/L). Cells were concentrated ten-fold by centrifugation at 4600 rpm for 20 mins. Inoculation was conducted in plants in the 3 true-leaf stage by injecting the bacterial culture into the axillary buds of the three youngest leaves. Two inoculations with the TYLCV isolate were performed. Plants were grown

in pots in a growth chamber with 25 °C temperature, 60 to 65% and 95 to 99% relative humidity (day/night), 34 μEm⁻²s⁻¹ irradiance and 16/8 photoperiod (light/dark).

2.3. Disease assessment

Symptom severity was assessed in each plant individually at 7, 14, 21 and 28 days post-inoculation (dpi) in studies 1 and 2, and at 14, 21 and 28 dpi in study 3. The assessment was based on the scale proposed by [Friedmann et al. \(1998\)](#), where 0 = no symptoms; 1 = very slight symptoms, with yellowing of the leaflet margins on apical leaves; 2 = mild symptoms, with some yellowing and minor curling of leaflet ends; 3 = a wide range of leaf yellowing, curling and cupping, with some reduction in size, yet the plants continue to grow; and 4 = severe symptoms, with very severe plant stunting and yellowing and pronounced cupping and curling, and the plants cease to grow.

The viral load accumulation was assessed by qPCR to complement and support the results obtained in the previous assays. The same genotypes used in the third symptom severity study were evaluated for both Muchamiel and De la pera. Viral accumulation was quantified by qPCR at 15 and 30 dpi. Total DNA was isolated from the apical leaf of five plants of each genotype using the CTAB method ([Doyle and Doyle, 1990](#)). After quantification using a Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), each sample was adjusted to a final concentration of 5 ng/μl. The qPCR was carried out in 15-μl reactions, containing 7.5 μl of the FastStart Essential DNA Green Master kit (Roche) mix, 1.5 μl of each primer (10 μM) and 15 ng of the isolated DNA as template. Primers TYLCV-INIA1-F (5'- CCCCCTTTAATTTGAATGGGCTT-3', positions 1907–1929) and TYLCV-INIA2-R (5'- CATTGATGACGT AGACCCGCA-3, positions 2017–1997) were used for the amplification of viral DNA ([Pérez-Padilla et al., 2020](#)). Amplification of the endogenous cytochrome oxidase gene was used as an internal control with the primer pair COX-F (5'- CGTCGCATTCCAGATTATCCA) and COX-R (5'-CAACTACGGATATATAAGAGCCAAAAGCTG-3'), described by [Weller et al. \(2020\)](#). All reactions were run in a Roche LightCycler 480. The cycling conditions were 95 °C for 10 min, and 40 cycles at 95 °C for 15 s, 65 °C for 30 s and 60 °C for 60 s. The cycle threshold (Ct) was calculated for the viral DNA and the internal control gene in each sample. Relative accumulation of TYLCV was estimated by the comparative Ct method, using the formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, where $\Delta\Delta Ct$ is the difference between the ΔCt of each sample ($\Delta Ct_{\text{sample}}$: Ct_{reference genes} – Ct_{virus}) and the ΔCt of the calibrator sample ($\Delta Ct_{\text{calibrator}}$). A negative control was used as the

Table 3

p-values of the one-factor GML analyses of variance, with genotypes as a factor. Significance levels: ns (*p* > 0.05), ** (*p* < 0.01), and *** (*p* < 0.001). The mean ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) and groups (values followed by the same letter are not significantly different at the 5% level by Fisher) obtained by Fisher's LSD tests are included. The genotypes analysed correspond to study 3.

Varietal type		15 dpi	30 dpi
Muchamiel	<i>p</i> -value	**	***
	De la pera	<i>p</i> -value	***
GML Test			
Fisher's Multiple Range Test			
Muchamiel	Genotype		
	<i>Ty-1/ty-5^a</i>	912.3 a	2653.6 a
	ss/SS ^a	7190.2 b	14,768.0 c
	<i>ty-5^a</i>	405.0 a	4369.8 ab
	<i>Ty-1^a</i>	97.0 a	621.8 a
	Control <i>Ty-1^b</i>	642.3 a	345.4 a
	Control ss/SS ^c	7622.43 b	8048.2 b
	Control <i>ty-5^b</i>	280.2 a	1077.9 a
De la pera	Genotype		
	<i>Ty-1/ty-5^a</i>	790.2 a	302.4 a
	ss/SS ^a	4184.2 a	15,160.8 c
	<i>ty-5^a</i>	2391.0 a	5255.7 b
	<i>Ty-1^a</i>	166.8 a	346.2 a
	Control <i>Ty-1^b</i>	138.0 a	236.5 a
	Control ss/SS ^c	11,548.2 b	13,485.4 c
	Control <i>ty-5^b</i>	280.2 a	1077.9 a

dpi: days post-inoculation. *Control *ty-5*: donor parent (line TX 468-RG). ^aBC5S1 breeding lines (containing the *Tm-2^a* and *Sw-5* alleles in the homozygous state). ^bBreeding line with only *Ty-1* or *ty-5* genes. ^cTraditional cultivars.

calibrator sample in all assays.

2.4. Statistical analysis

Analyses of variance were performed according to the one-factor generalized linear model, with genotypes as a factor. Fisher's Least Significant Difference (LSD) procedure was used for the discrimination of means with a confidence level of 95%. Statgraphics and Excel were used.

3. Results

All plants showed a homogeneous response depending on the genotype studied (Table 2). Susceptible controls (ss/SS^c) showed severe symptoms, especially from 14 dpi onwards. At this stage, the virus reproduces rapidly and spreads throughout the plant. The tolerant controls (*ty-5^b* and *Ty-1^b*) delayed the development of the disease. The symptoms were very mild and remained constant throughout the 28 dpi. The results of the breeding lines studied with all homozygous combinations of the *Ty-1* and *ty-5* genes were consistent with those of the controls. Susceptible genotypes (ss/SS^a) showed severe symptoms, and resistant genotypes (*Ty-1/ty-5^a*, *ty-5^a* and *Ty-1^a*) showed very mild symptoms. The phenotypic responses to TYLCV can be classified into two groups: the susceptible genotypes (ss/SS) for the two genes and the resistant genotypes (*Ty-1*, *ty-5* and *Ty-1/ty-5*), presenting *Ty-1*, *ty-5* or both. In all three studies, the susceptible genotypes showed clear symptoms (the average disease severity index (DSI) of the three studies was 3.94) in contrast to the tolerant genotypes (whose average DSI of the three studies was 0.31) (Table 2). The analysis of variance of the viral accumulation quantified by qPCR (included in study 3) showed statistically significant differences in the two varietal types, Muchamiel and De la pera (Table 3). The susceptible genotypes (ss/SS) showed the highest levels of virus accumulation, while the resistant genotypes (*Ty-1*, *ty-5* and *Ty-1/ty-5*) generally exhibited low levels of virus accumulation (Table 3).

The results obtained indicate that in the three disease incidence studies and in the viral accumulation analysis (included in study 3), the genotypes without *Ty-1* and *ty-5* genes (ss/SS) showed the highest degree of disease severity and viral load. In general, the remaining genotypes for one or both genes showed mild symptoms (Figs. 1, 2 y 3) and a low level of viral accumulation (Fig. 4). Differences were detected between genotypes carrying one or both genes. In studies 1 and 2 (Figs. 1 and 2), the symptoms observed in the phenotype of plants with the *Ty-1* gene (values ranging from 0.04 to 0.25) only appeared at 14 dpi in Muchamiel. These values were slightly lower than those observed in plants with *ty-5* in all cases (Figs. 1 and 2). This difference was most noticeable in the De la pera varietal type in study 1 (Fig. 1), with values ranging from 0.50 to 1.29, while the values of the rest of the genotypes with *ty-5* did not exceed 0.59 points (Figs. 1 and 2). In study 3, a new

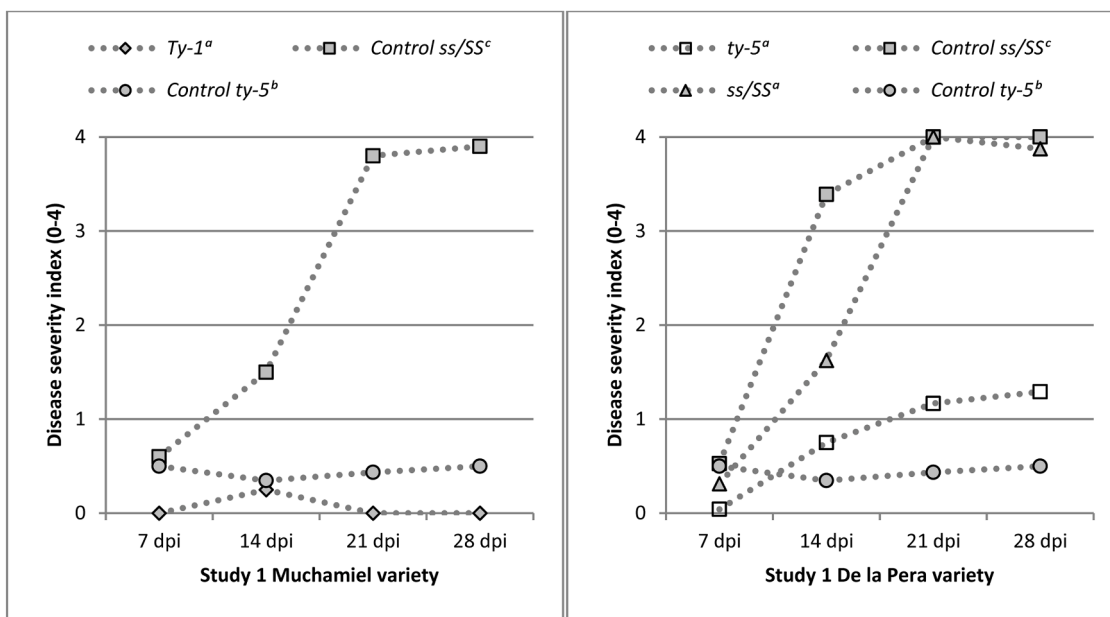


Fig. 1. Symptom severity (mean of plants tested) in study 1 after inoculation according to the scale proposed by Friedmann et al. (1998). dpi: days post-inoculation. *Control *ty-5*: donor parent (line TX 468-RG). ^aBC5S1 breeding lines (containing the *Tm-2^a* and *Sw-5* alleles in the homozygous state). ^bBreeding line with only *Ty-1* or *ty-5* genes. ^cTraditional cultivars.

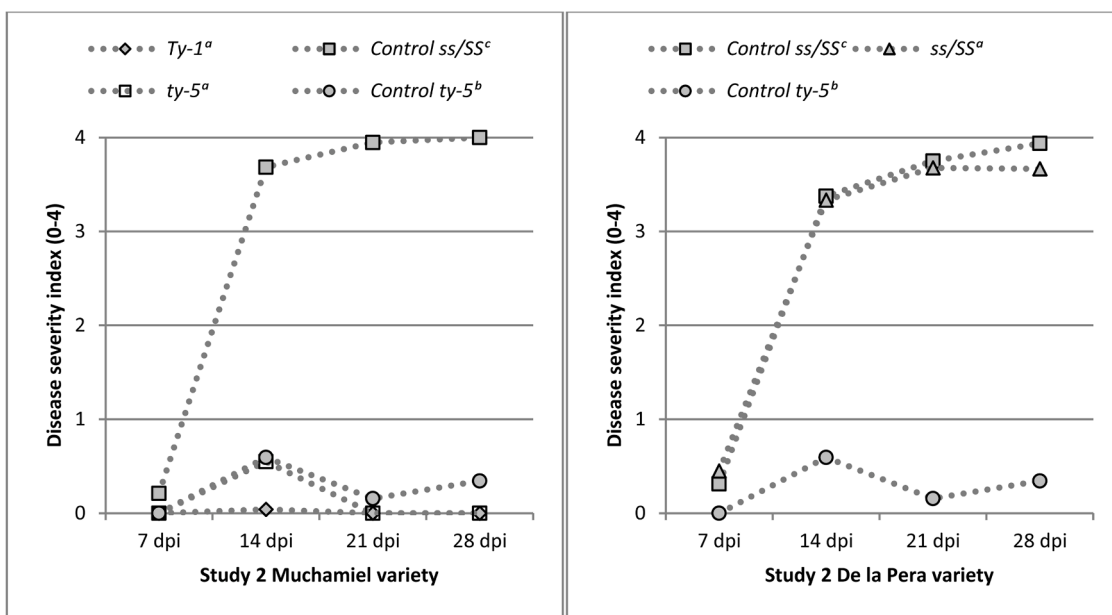


Fig. 2. Symptom severity (mean of plants tested) of study 2 after inoculation according to the scale proposed by Friedmann et al. (1998). dpi: days post-inoculation. *Control ty-5: donor parent (line TX 468-RG). ^aBC5S1 breeding lines (containing the *Tm-2^a* and *Sw-5* alleles in the homozygous state). ^bBreeding line with only *Ty-1* or *ty-5* genes. ^cTraditional cultivars.

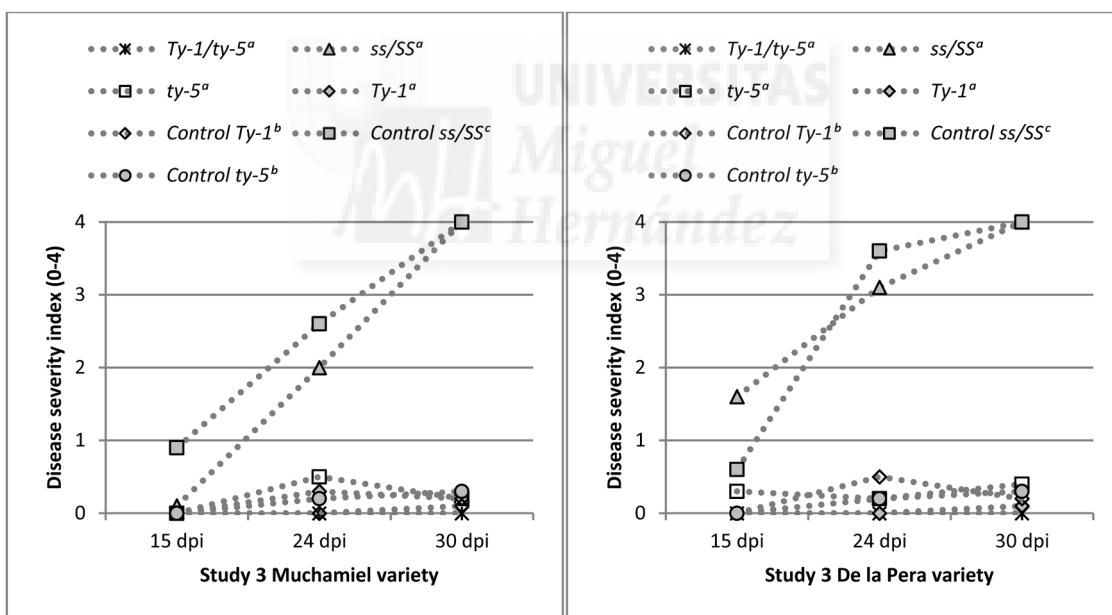


Fig. 3. Symptom severity (mean of plants tested) of study 3 after inoculation according to the scale proposed by Friedmann et al. (1998). dpi: days post-inoculation. *Control ty-5: donor parent (line TX 468-RG). ^aBC5S1 breeding lines (containing the *Tm-2^a* and *Sw-5* alleles in the homozygous state). ^bBreeding line with only *Ty-1* or *ty-5* genes. ^cTraditional cultivars.

genotype was introduced: the double homozygote for both genes (*Ty-1/ty-5*). The phenotype of this genotype showed no symptoms in any of the varietal types. In the other genotypes, the values were similar to those obtained in studies 1 and 2 (Fig. 3). In the case of viral accumulation, as shown in Fig. 4, two groups were differentiated: the genotypes containing the genes *Ty-1*, *ty-5* and *Ty-1/ty-5*, and those that did not (*ss/SS*). The *Ty-1/ty-5* genotype showed a higher viral load than the genotypes with some of the genes in some cases, despite being statistically grouped together. Viral accumulation in the varietal type De la pera at 30 dpi with genotype *ty-5^a* was higher than accumulation in the rest of the resistant genotypes, but still lower than in the susceptible genotypes

(Fig. 4).

4. Discussion

Ty genes have shown different levels of tolerance (Ji et al., 2007, 2009a; Shahid et al., 2013). All *Ty*-loci described have been shown to allow virus replication to varying degrees, which defines them as asymptomatic carriers (Yan et al., 2021). In the present study, mainly during the early stages, some resistant genotypes showed no symptoms, although they did show viral load. Pereira-Carvalho et al. (2015) suggested that using *ty-5* is an effective breeding method for reducing

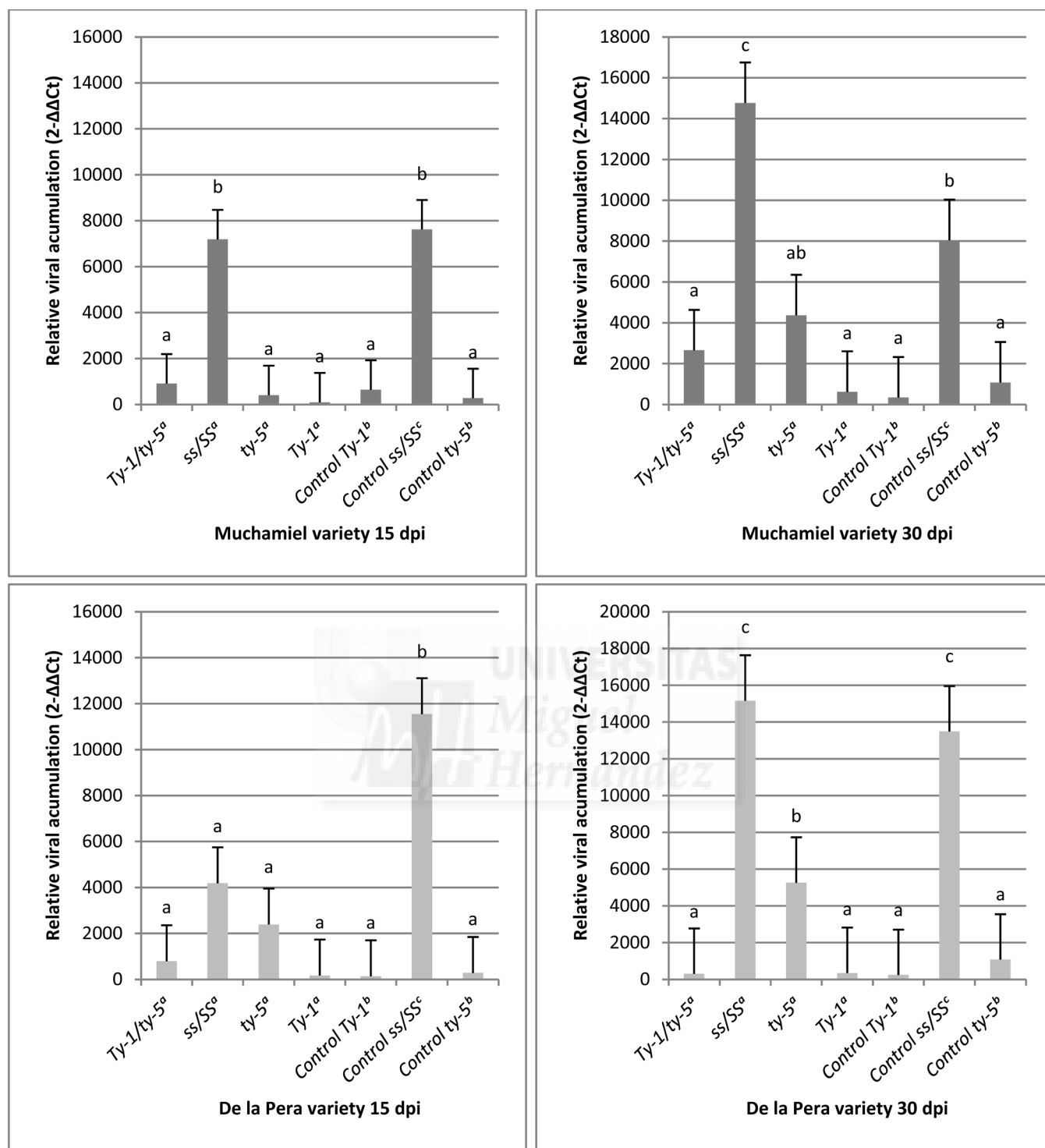


Fig. 4. Relative viral accumulation ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) of genotypes in study 3. Different letters indicate statistically significant differences according to Fisher's LSD test. Standard error is included. dpi: days post-inoculation. *Control ty-5: donor parent (line TX 468-RG). ^aBC5S1 breeding lines (containing the *Tm-2^a* and *Sw-5* alleles in the homozygous state). ^bBreeding line with only *Ty-1* or *ty-5* genes. ^cTraditional cultivars.

TYLCD damage. In a study aimed at understanding the restricted accumulation of an isolate of the TYLCV strain Israel (TYLCV-IL) in TX 468-RG and evaluating how this resistance could help limit the spread of the virus in field conditions, the researchers found that the monogenic recessive resistance to TYLCV-IL in TX 468-RG (the control genotype *ty-5^b* in this study) significantly hindered systemic virus infection. This resulted in a notable reduction in both primary (virus spread to healthy plants from an external source of viruliferous vectors) and secondary

(virus spread from virus-infected source plants to healthy plants) virus transmission. In Tunisia, in open field conditions, Elbaz et al. (2016) evaluated a set of tomato entries with different *Ty* combinations (*Ty-1*, *Ty-1/Ty-2*, *Ty-1/Ty-3/Ty-2*, *Ty-2*, *Ty-2/Ty-3*, *Ty-2/Ty-3a*, *ty-2/ty-5* and *ty-5*) provided by AVRDC. The trials were conducted in 2013 and 2015 from September to December, when whiteflies are abundant. The goal was to identify the specific genes and gene combinations that effectively reduced the incidence and severity of TYLCV caused by Tunisian

begomoviruses. The *Ty-1/Ty-3* allele provided the highest level of resistance. Entries with *Ty-1* and *Ty-1/Ty-2* were resistant to TYLCD and had similar resistance levels as *Ty-1/Ty-3*. However, the line homozygous for *ty-5* only did not provide high levels of resistance to TYLCD. *Ty-2/Ty-5* showed 32.35% and 43.3% greater reductions in TYLCD incidence and severity than the *Ty-5* entry, and these differences were significant. In another similar study, in an open field and during two growing seasons (September to February 2012–2013 and 2013–2014), the authors evaluated different combinations with the *Ty-1*, *Ty-2*, *Ty-3*, *Ty-3a* and *ty-5* genes. All lines containing the *Ty* genes performed better than susceptible controls, with lower disease incidence, severity and viral DNA load. Symptom severity was highest in lines carrying only *Ty-2*, followed by lines homozygous for *Ty-3a* and *Ty-2*. Lines carrying *ty-5* or *ty-5/Ty-2* remained consistently symptom-free in both years, and their mean viral loads were the lowest, although they were not statistically different from most other lines except those with *Ty-2* only (Al-Shihi et al., 2018).

In the current study, the *Ty-1/ty-5* genotype was the only one with no disease symptoms at any stage, despite showing a viral load. This means that, like in the cases of the other genotypes, there will always be the possibility of whitefly transmission and virus replication, leading to high levels of infection and potentially overcoming resistance. In the present study, the results are quite clear. However, considering the information available in other publications, it is challenging to definitively establish the behaviour of the *Ty-1* and *ty-5* genes due to the variations exhibited by different combinations of these genes, the TYLCV isolate and the varying degrees of infection. These differences may be due to the diversity of TYLCV-causing Begomoviruses (Al-Shihi et al., 2018) and their ability to overcome resistance (Yan et al. 2021).

The genotypes of the breeding lines studied also contained the *Tm2^a* and *Sw-5* alleles, as mentioned in Materials and Methods, Section 2.1. These genotypes could influence the plant response to symptom level and virus load. The results obtained suggest that the introgressed *Tm-2^a* and *Sw-5* alleles are not involved in the development of the disease or in the defence mechanism provided by the *Ty-1* and *ty-5* alleles. The behaviour of the genotypes containing *Tm-2^a* and *Sw-5* and their counterparts without them was similar in all the studies carried out. In this study, we have demonstrated that both *Ty-1* and *ty-5*, whether used together or individually, provide a similarly high level of resistance. Based on the performance of these lines carrying these genes, they could be used as parental lines in breeding programmes to obtain new cultivars with some added value. This could also lead to the development of lines that allow farmers to save seeds from different landraces for the following growing season. In addition, pyramidalization provides more effective and longer-lasting resistance over time. The virus will encounter more barriers in overcoming resistance and infecting the plant. When the virus exceeds a certain resistance, it can spread rapidly in certain cultivars, so the search for sources of resistance must continue (Yan et al., 2018). *Ty* gene pyramiding appears to be the best option for fighting against TYLCV. To this end, we began introducing *Ty-2* (Cabrera et al., 2021) in 2021, with the goal of obtaining *Ty-1/ty-5/Ty-2* lines and increasing genetic resistance to TYLCV. The performance of these genotypes will be reported in future publications.

Funding

J.Á.C. has the FPU18/01399 contract of the “Programa estatal de promoción del talento y su empleabilidad, Subprograma de Formación de Profesorado Universitario (FPU)”, del Ministerio de Universidades de España.

CRediT authorship contribution statement

José Ángel Cabrera: Writing – review & editing, Writing – original draft, Software, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Pedro Carbonell:** Methodology.

Aranzazu Alonso: Methodology. **Clara Pérez-Moro:** Methodology. **Ana Pérez de Castro:** Methodology, Writing – review & editing. **Juan José Ruiz:** Conceptualization, Writing – review & editing. **Santiago García-Martínez:** Conceptualization, Data curation, Writing – review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.scienta.2025.114012.

Data availability

Data will be made available on request.

References

- Abhary, M., Patil, B.L., Fauquet, C.M., 2007. Molecular biodiversity, taxonomy, and nomenclature of tomato yellow leaf curl-like viruses. In: Czosnek, H. (Ed.), *Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4769-5_6.
- Ahmed, M.A.Mahmoud, Neama, H.Osman, Hassan, A.A.Mohamed, 2023. Characterization of tomato yellow leaf curl virus resistance genes and genetic variability in commercial tomato F1 hybrids. *Scientia Horticult.* 318. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112088>.
- Al-Shihi, A.A., Peter, H., Al-Sadi, A.M., Al-Yahyai, R.A., Briddon, R.W., Deadman, M., Shahid, M.S., 2018. Evaluation of tomato inbred lines for resistance to the tomato yellow leaf curl disease complex in Oman. *Crop Prot* 110, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.04.001>.
- Anbinder, I., Reuveni, M., Azari, R., Paran, I., Nahon, S., Shlomo, H., Chen, L., Lapidot, M., Levin, I., 2009. Molecular dissection of *Tomato leaf curl virus* resistance in tomato line TY172 derived from *Solanum peruvianum*. *Theor. Appl. Genet.* 119, 519–530. <https://doi.org/10.1007/s00122-009-1060-z>.
- Cabrera, J.A., Carbonell, P., Salinas, J.F., Grau, A., Alonso, A., García-Martínez, S., Ruiz, J.J., 2021. Introducción del gen *Ty-2* en el Programa de mejora genética de Variedades Tradicionales de Tomate del CIAGRO-UMH. Libro De Actas del II Congreso Universitario En Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria. LIMENCO Orihuela, Spain.
- Cabrera, J.A., Carbonell, P., Salinas, J.F., Grau, A., Alonso, A., Hernández, F., Ruiz, J.J., García-Martínez, S., 2024. Effect of introgression of *ty-1* and *ty-5* genes on productivity, quality, and antioxidant compounds in De la Pera tomato breeding lines. *Agriculture* 14, 1192. <https://doi.org/10.3390/agriculture14071192>.
- Carbonell, P., Alonso, A., Grau, A., Salinas, J.F., García-Martínez, S., Ruiz, J.J., 2018. Twenty years of tomato breeding at EPSO-UMH: transfer resistance from wild types to local landraces from the first molecular markers to genotyping by sequencing (GBS). *Diversity* 10, 12. <https://doi.org/10.3390/d10010012>.
- Cohen, S., Harpaz, I., 1964. Periodic, rather than continual acquisition of new tomato virus by its vector, the tobacco whitefly (*Bemisia tabaci* Gennadius). *Entomol. Exp. Appl.* 7, 155–166.
- Cohen, S., Antignus, Y., 1994. Tomato yellow leaf curl virus, whitefly-borne geminivirus of tomatoes. In: Harris, Kerry F. (Ed.), *Advances in Disease Vector Research*. Texas A&M University: College Station, Texas, USA, pp. 259–288, 10.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12, 13–15.
- Elbaz, M., Hanson, P., Fgaier, S., Laarif, A., 2016. Evaluation of tomato entries with different combinations of resistance genes to tomato yellow leaf curl disease in Tunisia. *Plant Breed* 135, 525–530. <https://doi.org/10.1111/pbr.12375>.
- Fauquet, C.M., Maxwell, D.P., Gronenborn, B., Stanley, J., 2000. Revised proposal for naming geminiviruses. *Arch. Virol.* 145, 1743–1761. <https://doi.org/10.1007/s007050070089>.
- Friedmann, M., Lapidot, M., Cohen, S., Pilowsky, M., 1998. A novel source of resistance to Tomato yellow leaf curl virus exhibiting a symptomless reaction to viral infection. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123, 1004–1007. <https://doi.org/10.21273/JASHS.123.6.1004>.
- García-Martínez, S., Grau, A., Alonso, A., Rubio, F., Valero, M., Ruiz, J.J., 2011. UMH 1200, a breeding line within the Muchamiel tomato type resistant to three viruses. *HortSci. Horts* 46 (7), 1054–1055. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.46.7.1054>.
- García-Martínez, S., Grau, A., Alonso, A., Rubio, F., Valero, M., Ruiz, J.J., 2012. UMH 1203, a multiple virus-resistant fresh-market tomato breeding line for open-field conditions. *HortSci. Horts* 47, 124–125. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.47.1.124>.
- Hanson, P.M., Bernacchi, D., Green, S., Tanksley, S.D., Muniyappa, V., Padmaja, A.S., Chen, H., Kuo, G., Fang, D., Chen, J., 2000. Mapping a wild tomato introgression

- associated with tomato yellow leaf curl virus resistance in a cultivated tomato line. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 125, 15–20. <https://doi.org/10.21273/JASHS.125.1.15>.
- Hanson, P.M., Green, S.K., Kuo, G., 2006. *Ty-2*, a gene on chromosome 11 conditioning geminivirus resistance in tomato. In: Scott, J.W. (Ed.), Report of the Tomato Genetics Cooperative. University of Florida: Wimauma, FL, USA, pp. 17–18, 56.
- Hutton, S.F., Scott, J.W., Schuster, D.J., 2012. Recessive resistance to *tomato yellow leaf curl virus* from the tomato cultivar Tyking is located in the same region as *ty-5* on chromosome 4. *HortSci. Hort.* 47, 324–327. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.47.3.324>.
- Hutton, S.F., Scott, J.W., 2014. *Ty-6*, a major begomovirus resistance gene located on chromosome 10. In: Scott, J.W. (Ed.), Report of the Tomato Genetics Cooperative. University of Florida: Wimauma, FL, USA, pp. 14–18, 64.
- Ji, Y., Scott, J.W., Hanson, P., Graham, E., Maxwell, D.P., 2007. Sources of resistance, inheritance, and location of genetic loci conferring resistance to members of the tomato-infecting begomoviruses. In: Henryk, C. (Ed.), *Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease: Management, Molecular Biology, Breeding for Resistance*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 343–362.
- Ji, Y., Schuster, D.J., Scott, J.W., 2007a. *Ty-3*, a begomovirus resistance locus near the *Tomato yellow leaf curl virus* resistance locus *Ty-1* on chromosome 6 of tomato. *Mol. Breed.* 20, 271–284. <https://doi.org/10.1007/s11032-007-9089-7>.
- Ji, Y., Scott, J.W., Schuster, D.J., 2009. Toward fine mapping of the tomato yellow leaf curl virus resistance gene *ty-2* on chromosome 11 of tomato. *HortSci. Hort.* 44, 614–618. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.44.3.614>.
- Ji, Y., Scott, J.W., Schuster, D.J., Maxwell, D.P., 2009a. Molecular mapping of *ty-4*, a new *Tomato yellow leaf curl virus* resistance locus on chromosome 3 of tomato. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 134, 281–288. <https://doi.org/10.21273/JASHS.134.2.281>.
- Kheyr-Pour, A., Gronenborn, B., Czosneck, S., 1994. Agroinoculation of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) over comes the virus resistance of wild Lycopersicon species. *Plant Breed.* 112, 228–233. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1994.tb00675.x>.
- Kil, Eui-Joon., Byun, Hee-Seong., Hwang, Hyunsik., Lee, Kyeong-Yeoll., Choi, Hong-Soo., Kim, Chang-Seok., Lee, Sukchan., 2021. Tomato yellow leaf curl virus infection in a monocotyledonous weed (*Eleusine indica*). *Plant Pathol. J.* 37, 641–651. <https://doi.org/10.5423/PPJ.FT.11.2021.0162>.
- Lefeuve, P., Martin, D.P., Harkins, G., Lemey, P., Gray, A.J.A., Meredith, S., Lakay, F., Monjane, A., Lett, J.M., Varsani, A., Heydarnejad, J., 2010. La propagación del virus del rizado amarillo de las hojas del tomate desde Oriente Medio hasta el mundo. *PLoS Pathog* 6 (10), e1001164. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001164>.
- Moriones, E., Arnó, J., Accotto, G.P., Norris, E., Cavallarin, L., 1993. First report of tomato yellow leaf curl virus in Spain. *Plant Dis* 77, 953.
- Navas-Castillo, J., Sanchez-Campos, S., Díaz, J.A., Sáez-Alonso, E., Moriones, E., 1997. First report of *Tomato yellow leaf curl virus-is* in Spain: coexistence of two different geminiviruses in the same epidemic outbreak. *Plant Dis* 81, 1461. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.12.1461B>.
- Navas-Castillo, J., Fiallo-Olivé, E., 2011. Sánchez-Campos, S. Virus emergentes transmitidos por mosca blanca. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49, 219–248. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095235>.
- Ozores-Hampton, M., Stansly, P.A., McAvoy, E., 2013. Evaluation of round and romatyp tomato varieties and advanced breeding lines resistant to tomato yellow leaf curl virus in Florida. *HortTechnol. Hort.* 23 (5), 689–698. <https://doi.org/10.21273/HORTTECH.23.5.689>.
- Pérez de Castro, A.M., 2007. Mejora Genética Para La Resistencia a Los Geminivirus *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* (TYLCV) y y *Tomato Yellow Leaf Curl Sardinia Virus* (TYLCSV) En Tomate [Tesis Doctoral]. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, Spain. <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/135825>.
- Pérez de Castro, A., Díez, M.J., Nuez, F., 2008. Exploiting partial resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* derived from *Solanum pimpinellifolium* UPV 16991. *Plant Dis* 92, 1083–1090. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-7-1083>.
- Pérez-Padilla, V., Fortes, I.M., Romero-Rodríguez, B., Arroyo-Mateos, M., Castillo, A.G., Moyano, C., De León, L., Moriones, E., 2020. Revisiting seed transmission of the type strain of *tomato yellow leaf curl virus* in tomato plants. *Phytopathology* 110, 121–129. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-19-0232-FI>.
- Pereira-Carvalho, R.C., Díaz-Pendón, J.A., Fonseca, M.E.N., Boiteux, L.S., Fernández-Muñoz, R., Moriones, E., Resende, R.O., 2015. Recessive resistance derived from tomato cv. Tyking-limits drastically the spread of *tomato yellow leaf curl virus*. *Viruses* 7, 2518–2533. <https://doi.org/10.3390/v7052518>.
- Picó, B., Díez, M.J., Nuez, F., 1996. Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. The *Tomato yellow leaf curl virus*—a review. *Sci. Hortic.* 67, 151–196. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(96\)00945-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(96)00945-4).
- Prasanna, H.C., Sinha, D.P., Rai, G.K., Krishna, R., Kashyap, S.P., Singh, N.K., Singh, M., Malathi, V.G., 2014. Pyramiding *ty-2* and *ty-3* genes for resistance to monopartite and bipartite tomato leaf curl viruses of India. *Plant Pathol* 64, 256–264. <https://doi.org/10.1111/ppa.12267>.
- Reina, J., Jiménez, J., Bejarano, E.R., Guerra, J.M., Cuadrado, I.M., García, C., 1994. El virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV). *Hortofruticultura* 6, 36–40.
- Ren, Y., Tao, X., Li, D., Yang, X., Zhou, X., 2022. *ty-5* confers broad-spectrum resistance to geminiviruses. *Viruses* 14, 1804. <https://doi.org/10.3390/v14081804>.
- Rojas, María del Rosario, 2000. Los begomovirus. In: Morales Garzón, José (Ed.), *Bean Golden Mosaic and Other Diseases of Common Bean Caused By Whitefly-Transmitted Geminiviruses in Latin America*; Francisco. Centro Internacional de Agricultura Tropical: Palmira (Valle), Colombia, pp. 87–98.
- Rojas, M.R., Hagen, C., Lucas, W.J., Gilbertson, R.L., 2005. Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annual Rev. Phytopathol.* 43, 361–394. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135939>.
- Sánchez-Campos, S., Navas-Castillo, J., Camero, R., Soria, C., Díaz, J.A., Moriones, E., 1999. Displacement of *tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV)-Sr by TYLCV-is in tomato epidemics in Spain. *Phytopathology* 89 (11), 1038–1043. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.11.1038>.
- Scott, J.W., Hutton, S.F., Freeman, J.H.Fla, 2015. 8638B and Fla. 8624 tomato breeding lines with begomovirus resistance genes *ty-5* plus *ty-6* and *ty-6*, respectively. *HortSci. Hort.* 50, 1405–1407. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.50.9.1405>.
- Shahid, M.S., Ito, T., Kimbara, J., Onozato, A., Natsuaki, K.T., Ikegami, M., 2013. Evaluation of tomato hybrids carrying *ty-1* and *ty-2* loci to Japanese monopartite begomovirus species. *J. Phytopathol.* 161, 205–209. <https://doi.org/10.1111/jph.12041>.
- Silva, João Paulo Herrera da, Zebini, F.Murilo, 2023. Taxonomic classification of geminiviruses based on pairwise sequence comparisons. In: Elizabeth, P.B. (Ed.), *Plant-Virus Interactions*. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular: Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil; and Departamen of Agricultural Sciences: University of Helsinki, Helsinki, Finland, pp. 21–32. Fontes and Kristiina Mäkinen.
- Vasudeva, R.S., Sam Raj, J., 1948. A leaf curl disease of tomato. *Phytopathology* 38, 364–369.
- Verlaan, M.G., Hutton, S.F., Ibrahim, R.M., Kormelink, R., Visser, R.G., Scott, J.W., Edwards, J.D., Bai, Y., 2013. The *tomato yellow leaf curl virus* resistance genes *ty-1* and *ty-3* are allelic and code for DFDGD-class RNA-dependent RNA polymerases. *PLoS Genet* 9, e1003399. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003399>.
- Wang, Y., Jiang, J., Zhao, L., Zhou, R., Yu, W., Zhao, T., 2018. Application of whole genome resequencing in mapping of a tomato yellow leaf curl virus resistance gene. *Sci. Rep* 8, 9592. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27925-w>.
- Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N.C., Boonham, N., Stead, D.E., 2020. Detection of *ralsotonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2853–2858. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.7.2853-2858.2000>.
- Yan, Z., Pérez-de-Castro, A., Díez, M.J., Hutton, S.F., Visser, R.G.F., Wolters, A.-M.A., Bai, Y., Li, J., 2018. Resistance to *tomato yellow leaf curl virus* in tomato germplasm. *Front. Plant Sci.* 9, 1198. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01198>.
- Yan, Z., Wolters, A.-M.A., Navas-Castillo, J., Bai, Y., 2021. The global dimension of *tomato yellow leaf curl disease*: current status and breeding perspectives. *Microorganisms* 9, 740. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040740>.
- Zamir, D., Michelson, I.E., Zakay, Y., Navot, N., Zeidan, M., Sarfatti, M., Eshed, Y., Harel, E., Pleban, T., van Oss, H., et al., 1994. Mapping and introgression of a *tomato yellow leaf curl virus* tolerance gene. *Ty-1*. *Theor. Appl. Genet.* 88, 141–146. <https://doi.org/10.1007/BF00225889>.