



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la
Agrodiversidad Valenciana

Evaluación de la resistencia a TYLCV en materiales de
tomate portadores del gen de resistencia Ty-1

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Mejora Genética Vegetal

AUTOR/A: Gil Molina, Mireya

Tutor/a: Pérez de Castro, Ana María

Director/a Experimental: Prósper Ortega, Laura

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural



Instituto de Conservación y Mejora
de la Agrobiodiversidad Valenciana

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Máster en Mejora Genética Vegetal

Universitat Politècnica de València

**“Evaluación de la resistencia a TYLCV en
materiales de tomate portadores del gen de
resistencia *Ty-1*”**

Autor/a: Mireya Gil Molina

Director/a: Dra. Ana María Pérez de Castro

Director/a Experimental: Laura Prósper Ortega

Curso Académico 2023/2024

Valencia, Julio 2024

RESUMEN

La enfermedad del rizado amarillo del tomate (TYLCD) es causante de muchas pérdidas económicas y productivas en los cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) a nivel mundial, destacando, sobre todo, en las zonas cálidas y templadas. Esta enfermedad es causada por diferentes especies virales de la familia de los Geminivirus, conocidos como Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), transmitidos por la mosca blanca, *Bemisia tabaci*. Actualmente, no se dispone de una solución definitiva ante esta enfermedad, ya que los materiales siguen mostrando síntomas cuando son sometidos a una infección temprana o a una elevada presión de inóculo.

Se conocen diferentes genes de resistencia procedentes de distintas entradas silvestres relacionadas con el tomate. En este trabajo, desarrollado en colaboración entre el Departamento de Biología Aplicada de la Universidad Miguel Hernández (UMH) y el Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV), de la Universitat Politècnica de València (UPV), se han evaluado materiales, híbridos, retrocruces y recombinantes en la región asociado a la resistencia, de distintas variedades tradicionales de tomate portadores del gen de resistencia *Ty-1*, procedente de *Solanum chilense*. Estos materiales fueron proporcionados por el Departamento de Biología Aplicada de la UMH. Para la evaluación de la resistencia, se llevó a cabo la agroinoculación de la cepa TYLCV-IL (cedida por el Dr. E. R. Bejarano, de la Universidad de Málaga) en el estado de plántula. El seguimiento de la enfermedad se realizó tanto de forma visual (a los 7, 14, 21 y 28 días post inoculación, dpi), como mediante la cuantificación del ADN viral mediante PCR cuantitativa a los 14 y 28 dpi.

Se confirmó la resistencia en los materiales portadores del alelo en todos los fondos genéticos analizados. Esta resistencia se manifestó tanto a nivel visual, con la permanencia de las plantas prácticamente asintomáticas o con síntomas muy ligeros, como mediante la reducción de la acumulación viral tras la inoculación. Mediante futuros trabajos podrían fijarse estos materiales y obtener variedades tradicionales con resistencia a TYLCV.

Palabras clave: tomate (*Solanum lycopersicum* L.), variedades tradicionales, TYLCV, gen de resistencia.

Autor: Dña. Mireya Gil Molina

Tutora: Prof. Dña. Ana María Pérez de Castro

Directora Experimental: Dña. Laura Prósper Ortega

Valencia, julio de 2024

ABSTRACT

Tomato yellow leaf curl disease (TYLCD) causes significant economic and productive losses in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) crops worldwide, especially in warm and temperate regions. This disease is caused by different viral species of the Geminivirus family, known as Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), transmitted by the whitefly, *Bemisia tabaci*. Currently, there is no definitive solution for this disease, as the materials continue to show symptoms when subjected to early infection or high inoculum pressure.

Different resistance genes from various wild tomato relatives are known. In this work, developed in collaboration between the Department of Applied Biology of the Miguel Hernández University (UMH) and the University Institute for the Conservation and Improvement of Valencian Agrobiodiversity (COMAV) of the Polytechnic University of Valencia (UPV), consisted on the evaluation of plant materials, hybrids, backcrosses and recombinants of different traditional varieties, carrying the *Ty-1* resistance gene, derived from *Solanum chilense*. These materials were provided by the Department of Applied Biology at UMH. For the evaluation, agroinoculation of the TYLCV-IL strain (provided by Dr. E. R. Bejarano, from the University of Málaga) was carried out in the seedling stage. Disease monitoring was conducted both visually (at 7, 14, 21 and 28 days post inoculation, dpi) and through the quantification of viral DNA with quantitative PCR at 14 and 28 dpi.

Resistance was confirmed in the materials carrying the allele in all analysed genetic backgrounds. This resistance was evident both visually, with plants remaining practically asymptomatic or showing very mild symptoms, and through the reduction of viral accumulation after inoculation. Future works could fix these materials and develop traditional varieties with resistance to TYLCV.

Keywords: tomato (*Solanum lycopersicum* L.), traditional varieties, TYLCV, resistance gene.

Student: Mireya Gil Molina

Tutor: Ana María Pérez de Castro

Co-tutor: Laura Prósper Ortega

Valencia, July 2024

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Raúl y Carmina, por darme siempre la libertad para crecer y ser yo misma. Por no ponerme nunca barreras y por su apoyo incondicional.

A mi hermana, Rebeca, porque sin ella nada sería lo mismo.

A mis abuelos, porque espero que estén orgullosos de la persona en la que me he convertido.

A Andrés por ser mi hogar en cualquier ciudad.

A mi familia y amigos de siempre, por su apoyo en todo momento.

A mi tutora, Ana Pérez de Castro, por darme la oportunidad de realizar este trabajo bajo su dirección y brindarme toda su experiencia y ayuda.

A Laura y todas las compañeras del laboratorio por su respaldo durante estos meses.

Al COMAV por permitirme el uso de sus instalaciones para llevar a cabo este trabajo.

En general, a todas las personas que de una forma u otra me han ayudado a llegar hasta aquí.

Gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Taxonomía del tomate	1
1.2. Especies relacionadas con el tomate	2
1.3. Importancia económica del tomate.....	4
1.4. Enfermedades de etiología viral más importantes en tomate	5
1.5. Enfermedad del rizado amarillo del tomate	5
1.5.1. Historia y distribución de la enfermedad	5
1.5.2. Biología.....	6
1.5.3. Virus del rizado amarillo del tomate (Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV)	8
1.5.4. Mecanismos de transmisión de TYLCV	9
1.5.5. Sintomatología	9
1.5.6. Mejora genética	10
1.5.7. Genes de resistencia	11
1.6. Variedades tradicionales de tomate: susceptibilidad a virosis y resistencia genética.....	13
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1. Material vegetal.....	15
3.2. Condiciones de cultivo	17
3.3. Inoculación.....	17
3.4. Seguimiento de la enfermedad	18
3.4.1. Evaluación visual de síntomas	18
3.4.2. Detección del ADN viral	19
3.5. Genotipado mediante marcadores asociados al gen Ty-1.....	20
3.6. Análisis estadístico	21
4. RESULTADOS.....	21
4.1. EVALUACIÓN DE LOS HÍBRIDOS	21
4.2. EVALUACIÓN DE LOS RETROCRUCES.....	24
4.3. EVALUACIÓN DE LOS RECOMBINANTES	26
5. DISCUSIÓN	28
6. CONCLUSIONES	30
7. BIBLIOGRAFÍA.....	31
8. ANEXOS.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de cruzabilidad entre el tomate y sus especies silvestres (Díez & Nuez, 2008).....	4
Figura 2. Porcentaje de la producción mundial de tomate por continentes, año 2022. Fuente: FAO STAT (2024).....	5
Figura 3. Síntomas característicos de la enfermedad causados por el TYLCV en plantas de tomate.	10
Figura 4. Inoculación mediante inyección en las axilas de las plántulas de tomate.	18
Figura 5. Síntomas observados en las plantas control con susceptibilidad a TYLCV a los 28 dpi	23
Figura 6. Promedio (\pm error estándar) de índices de gravedad de las líneas evaluadas los 14, 21 y 28 días post inoculación (DPI). En azul, los híbridos; en rojo, los controles susceptibles; en verde, los controles resistentes. Letras distintas para los genotipos en cada fecha de muestreo indican diferencias significativas (test LSD, $p < 0,05$).....	23
Figura 7. Acumulación relativa de ADN viral correspondiente a los 14 y 28 DPI en los híbridos expresada como $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Letras distintas para los genotipos en cada fecha de muestreo indican diferencias significativas (test LSD, $p < 0,05$)	24
Figura 8. Promedio (\pm error estándar) de índices de gravedad de las líneas evaluadas los 14, 21 y 28 días post inoculación (DPI). En azul, los retrocruces; en rojo, los controles susceptibles; en verde, los controles resistentes. Letras distintas para los genotipos en cada fecha de muestreo indican diferencias significativas (test LSD, $p < 0,05$).....	25
Figura 9. Acumulación relativa de ADN viral correspondiente a los 14 y 28 DPI en los retrocruces expresada como $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Letras distintas para los genotipos en cada fecha de muestreo indican diferencias significativas (test LSD, $p < 0,05$).....	26
Figura 10. Promedio (\pm error estándar) de índices de gravedad de las líneas evaluadas los 14, 21 y 28 días post inoculación (DPI). En azul, los recombinantes; en rojo, los controles susceptibles; en verde, los controles resistentes. Letras distintas para los genotipos en cada fecha de muestreo indican diferencias significativas (test LSD, $p < 0,05$).	27
Figura 11. Acumulación relativa de ADN viral correspondiente a los 14 y 28 DPI en los recombinantes expresada como $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Letras distintas para los genotipos en cada fecha de muestreo indican diferencias significativas (test LSD, $p < 0,05$).....	27

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía del género <i>Solanum</i> L.	1
Tabla 2. Clasificación del tomate y de sus especies relacionadas de acuerdo a Peralta <i>et al</i> (2008).	3
Tabla 3. Genotipos utilizados en el desarrollo del trabajo, así como su combinación de alelos para los genes de resistencia a ToMV, TSWV y TYLCV.	16
Tabla 4. Cebadores utilizados en la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) para detectar los virus asociados a la enfermedad del rizado amarillo del tomate y los genes citocromo oxidasa (COX) de las plantas.	20
Tabla 5. Marcador utilizado en el genotipado de las líneas evaluadas.	20

ABREVIATURAS

CP: Proteína de la cápside

dNTPs: Deoxinucleótidos trifosfato

dsDNA: ADN bicatenario

DSI: Disease Severity Index

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

HRM: High Resolution Melting

ICTV: Comité Internacional de Taxonomía de Virus

MP: Proteína del movimiento

ODS: Objetivos de Desarrollo Sostenible

ORF: Open Reading Frame

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

REn: Potenciador de la replicación

Rep: Proteína asociada a la replicación

ssDNA: ADN monocatenario

Sw5: Gen de resistencia al virus del bronceado del tomate

Tm-2^a: Gen de resistencia al virus del mosaico del tomate

TrAP: Activador transcripcional

TYLCD: Enfermedad del rizado amarillo del tomate

TYLCV: Virus del rizado amarillo del tomate

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Taxonomía del tomate

El tomate, *Solanum lycopersicum* L., pertenece a la familia botánica *Solanaceae*, la cual incluye alrededor de 4000 especies con una gran diversidad morfológica. Dentro de esta familia se incluyen cultivos económicamente muy importantes, como la patata (*Solanum tuberosum* L.), el tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), la berenjena (*Solanum melongena* L.), el pimiento (*Capsicum* spp.) e incluso especies ornamentales como *Petunia* spp (Pavan et al., 2009).

Desde la introducción del tomate en Europa en el siglo XVI, los botánicos reconocieron la estrecha relación de los tomates con el género *Solanum*. Fue Tournefort (1694), el primero en considerar a los tomates cultivados con grandes frutos multiloculares bajo el género *Lycopersicon* y mantuvo a las especies biloculares como *Solanum*. De acuerdo con Miller (1754), el tomate empezó a clasificarse como *Lycopersicon esculentum* (especie tipo), existiendo también *L. peruvianum* y *L. pimpinellifolium*. Rick (1979) propuso una clasificación basada en las relaciones de cruce. Reconoció nueve especies de tomate silvestre, clasificadas en dos complejos: *L. esculentum* y *L. peruvianum*. El primero de ellos incluía siete especies autocompatibles y fácilmente cruzables, mientras que el otro complejo incluía las especies autoincompatibles *L. peruvianum* y *L. chilense*, que rara vez cruzaban con *L. esculentum*.

Los diferentes criterios utilizados en la clasificación han llevado a diferentes números de especies, subespecies y variedades, con diversas hipótesis. Actualmente, numerosos datos morfológicos y secuencias moleculares respaldan su inclusión dentro del género *Solanum* L., resultando en una nueva nomenclatura, *Solanum lycopersicum* (Peralta et al., 2005). La clasificación más aceptada en la actualidad es la propuesta por Peralta, Spooner & Knapp (2008) (Peralta et al., 2008).

Tabla 1. Taxonomía del género *Solanum* L.

Reino	Plantae
Subreino	Traqueobionta
Superdivisión	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Género	<i>Solanum</i> L.
Especie	<i>Solanum lycopersicum</i> L.

1.2. Especies relacionadas con el tomate

Las especies silvestres son fuentes de variación alélica útil que se usan para tratar de superar los estreses bióticos y abióticos en programas de mejora genética, ya que suelen crecer en hábitats con condiciones desfavorables para las especies comerciales. En el caso del tomate, las especies silvestres relacionadas son nativas de América del Sur, concretamente desde la región costera de Ecuador, a través de Perú hasta el norte de Chile, incluyendo las Islas Galápagos. Estas regiones se caracterizan por tener ambientes muy variados debido a las diferencias de altitud y a los diversos hábitats ecológicos característicos de la geografía andina, lo cual ha generado que haya una gran adaptación local y una gran diversidad genética entre las especies silvestres de tomate. Es por ello que se usan en muchas ocasiones para responder a problemas actuales y futuros del tomate (cambio climático, enfermedades...) e incluso se utilizan para dotar de una mayor calidad nutricional a las nuevas variedades obtenidas (Khazaei, 2022; Ramírez-Ojeda et al., 2021).

La evidencia de las relaciones filogenéticas de estas especies silvestres ha sido descrita en detalle por Peralta et al. (2008), quienes han propuesto una clasificación basada en la existencia de tres secciones: *Lycopersicon*, *Lycopersicoides* y *Juglandifolia*. La sección *Lycopersicon* comprende al tomate cultivado (*S. lycopersicum* L.) y 12 especies silvestres relacionadas, integradas en cuatro grupos (Tabla 2): *Lycopersicon*, *Arcanum*, *Eriopersicon* y *Neolycopersicon* (Peralta et al., 2008; Ramírez-Ojeda et al., 2021). Esta clasificación ha sido verificada por evidencia molecular, genómica y transcriptómica de los tomates silvestres (Pease et al., 2016).

La hibridación interespecífica es fundamental a la hora de plantear programas de mejora (Mallet, 2008). En el caso del tomate, existe una gran variedad de especies silvestres que poseen una gran fuente de caracteres que pueden ser de interés para mejorar las variedades comerciales. Para obtener cultivares resistentes, se pueden transferir genes de resistencia de especies silvestres mediante la hibridación interespecífica (Ghani et al., 2020).

Tabla 2. Clasificación del tomate y de sus especies relacionadas de acuerdo con Peralta *et al.* (2008).

Sección	Grupo	Especies
Lycopersicon	Lycopersicon	<i>S. cheesmaniae</i> (L. Riley) Fosberg
		<i>S. galapaguense</i> S. Darwin & Peralta
		<i>S. lycopersicum</i> L.
		<i>S. pimpinellifolium</i> L.
	Arcanum	<i>S. arcanum</i> Peralta
		<i>S. chmielewskii</i> (C.M. Rick, Kesicki, Fobes & M. Holle) D.M. Spooner, G.J. Anderson & R.K. Jansen
		<i>S. neorickii</i> (C.M. Rick, Kesicki, Fobes & M. Holle) D.M. Spooner, G.J. Anderson & R.K. Jansen
		<i>S. chilense</i> (Dunal) Reiche
		<i>S. corneliomulleri</i> J.F. Macbr.
		<i>S. habrochaites</i> S. Knapp & D.M. Spooner
	Eriopersicon	<i>S. huaylasense</i> Peralta
		<i>S. peruvianum</i> L.
		<i>S. pennelli</i> Correll
		<i>S. lycopersicoides</i> Dunal
Lycopersicoides		<i>S. sitiens</i> I.M. Johnst
		<i>S. juglandifolium</i> Dunal
Juglandifolia		<i>S. ochranthum</i> Dunal

El tomate cultivado presenta alrededor del 5% de la variación genética total del acervo genético del tomate, mientras que los de tipo silvestre conservan una gran diversidad genética para muchos rasgos de gran importancia económica. Por ello, es de vital importancia conocer la distancia filogenética y establecer relaciones de cruzabilidad entre estas especies de tomate (Díez & Nuez, 2008; Peralta *et al.*, 2005). Las secciones *Lycopersicoides* y *Juglandifolia* son las más distantes del tomate cultivado, por lo que son las que más problemas de cruzabilidad presentan (Figura 1). Existen tanto barreras pre-cigóticas, como post-cigóticas: para superar estas últimas es posible recurrir a diferentes técnicas, como el rescate de embriones y su cultivo *in vitro* (Buteme *et al.*, 2021).

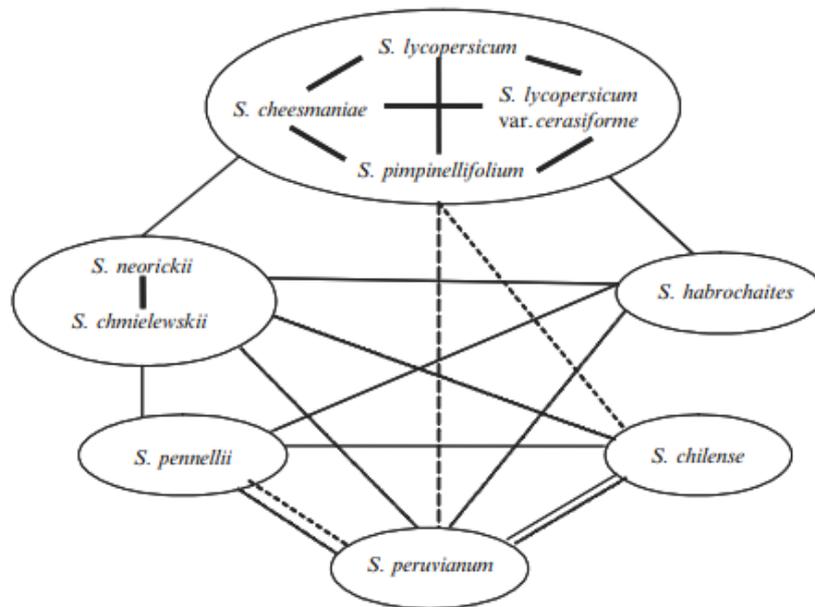


Figura 1. Diagrama de cruzabilidad entre el tomate y sus especies silvestres (Díez & Nuez, 2008).

1.3. Importancia económica del tomate

El tomate es la hortaliza más consumida en todo el mundo. Su demanda sigue aumentando debido a factores como su textura, sabor, aroma y su composición nutricional, puesto que está muy enriquecido en vitaminas, minerales y diferentes carotenoides con gran poder antioxidante, relacionados con la prevención de enfermedades como el cáncer (Dipple et al., 2024).

Esta especie es cultivada en numerosos países, destacando China, India, Turquía, Estados Unidos, Egipto, Italia y España (FAO-STAT, 2024).

La producción de tomate durante el año 2022 alcanzó 186.107.972 toneladas a nivel mundial. Destaca especialmente el continente asiático, cuya producción alcanzó ese año las 114.728.464 toneladas (63,9% del total de producción). El segundo, tercer y cuarto lugar fueron ocupados por América (12,6%), África (12,3%) y Europa (11,0%), respectivamente (Figura 2). En España, el volumen de producción fue de 3.651.940 toneladas en este año, con una superficie dedicada a la producción de 45.150 ha. Por tanto, el rendimiento medio por metro cuadrado en nuestro país fue 8,09 kilos (FAO-STAT, 2024).

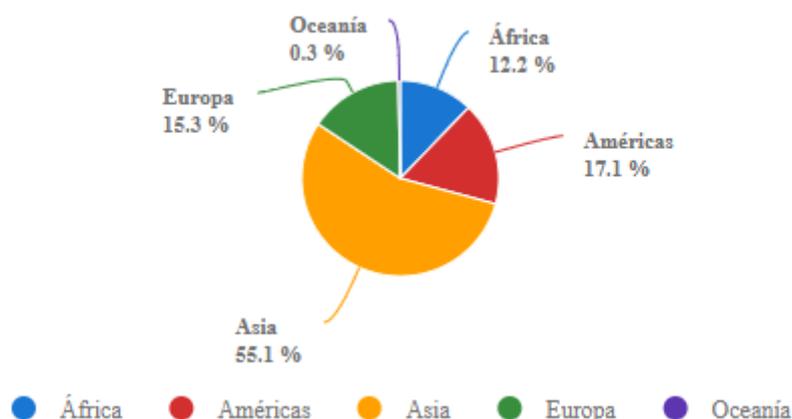


Figura 2. Porcentaje de la producción mundial de tomate por continentes, año 2022. Fuente: FAO STAT (2024).

1.4. Enfermedades de etiología viral más importantes en tomate

La producción mundial de tomate se ha visto obstaculizada por el aumento de la incidencia de enfermedades virales. La alta heterogeneidad genética de los virus que afectan al tomate, debido a sus altas tasas de mutación, han llevado a que las estrategias de control sean ineficaces y a la rápida propagación de los virus (Ong et al., 2020).

Además, los cambios en las condiciones climáticas pueden favorecer la propagación y el establecimiento exitoso de estos virus y sus vectores en áreas desfavorables. Lo mismo ocurre con el aumento de los viajes internacionales y el comercio de materiales vegetales, puesto que aumentan el riesgo de introducir nuevos virus y vectores en los sistemas de producción (Hanssen et al., 2010).

Entre las enfermedades virales más importantes, podemos destacar el virus del mosaico del tomate (Tomato mosaic virus, ToMV), el virus del bronceado del tomate (Tomato spotted wilt virus, TSWV), el virus del fruto rugoso del tomate (Tomato brown rugose fruit virus, ToBRFV) y el conjunto de virus causantes de la enfermedad del rizado amarillo del tomate (Tomato yellow leaf curl disease, TYLCD) (Panno et al., 2021).

1.5. Enfermedad del rizado amarillo del tomate

1.5.1. Historia y distribución de la enfermedad

La enfermedad del rizado amarillo del tomate (TYLCD) es muy importante y en los últimos años ha causado serios problemas económicos en la producción mundial de tomate, sobre todo en las zonas templadas y cálidas (Yan et al., 2021). La primera evidencia del daño económico a los cultivos de hortalizas causados por *Bemisia tabaci* se registró en Israel en el año 1931, y desde 1935 ha sido una plaga permanente, principalmente en el Valle del Jordán. Fue en 1959,

año en el que hubo un fuerte brote de *B. tabaci* en los valles del Jordán y Bet She'an, cuando se confirmó la naturaleza viral de la enfermedad y su propagación a través de este vector, pudiéndose purificar el TYLCV en 1988 (Cohen & Antignus, 1994).

La enfermedad no estuvo presente en Europa hasta el año 1988, cuando se reportó en el sur de Italia. Debido a que *B. tabaci* se encuentra presente en los invernaderos a lo largo del continente, la expansión de la enfermedad fue más rápida. En el año 1992, las plantas de tomate del este de España mostraron los primeros síntomas de la enfermedad, y tras ser analizadas se pudo comprobar que se trataba de la especie *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus*. Desde entonces, el TYLCV se ha propagado por todas las principales regiones productoras de hortalizas del sur y sureste de España, donde se ha convertido en el factor limitante para la producción de tomate durante el verano y el otoño (Sánchez-Campos et al., 1999; Zhang et al., 2009). En la década de los 90, la enfermedad alcanzó el Nuevo Mundo y rápidamente se propagó por el norte de América y por el Caribe (Pérezfarres et al., 2012). Actualmente se encuentra presente en todos los continentes del planeta, a excepción de la Antártida (Ramos et al., 2019).

Es causada por un complejo de especies virales pertenecientes al género *Begomovirus*, de la familia *Geminiviridae*, de las cuales la más extendida es la especie originaria de Israel (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) (Pérez de Castro et al., 2010). Se transmite por medio de la mosca blanca, *Bemisia tabaci*, la cual no solo actúa como vector del virus del rizado amarillo del tomate, sino que también actúa causando daños directos en las plantas de tomate al alimentarse del floema, provocando desórdenes fisiológicos y promoviendo el crecimiento de los mohos de hollín, que reducen la eficiencia fotosintética (Kumaraswamy et al., 2024).

Durante las últimas dos décadas, los begomovirus y *B. tabaci* han sido considerados como los complejos virus-vector más importantes económicamente, amenazando los principales cultivos de hortalizas y extendiéndose a otras regiones principalmente a través de actividades humanas y del comercio internacional (Kanakala & Ghanim, 2019). Además, las moscas blancas son capaces de aumentar su rango de distribución geográfica y de plantas hospedadoras debido a la existencia de una amplia gama de diferencias genéticas en las poblaciones de *B. tabaci*. Existen estudios que muestran una adaptación, por medio de la selección, de las poblaciones locales de este vector. (Oliveira et al., 2001).

1.5.2. Biología

La familia *Geminiviridae* está compuesta por catorce géneros: *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Capulavirus*, *Citlodavirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Grablovirus*, *Maldovirus*, *Mastrevirus*, *Mulcrilevirus*, *Opunvirus*, *Topocuvirus*, *Turncurtovirus* y *Topilevirus*, siendo el género *Begomovirus*, con 445 especies, el mayor de la virosfera (da Silva & Zerbini, 2024). Los

géneros se diferencian entre sí dependiendo de su gama de hospedadores, del tipo de vector, de la organización del genoma y de sus relaciones fitogenéticas (Fiallo-Olivé et al., 2021).

Los virus de la mayoría de los géneros de la familia tienen genomas monopartitos, mientras que los del género *Begomovirus* presentan tanto genomas monopartitos como bipartitos, siendo estos últimos los más frecuentes. Constan de dos componentes circulares monocatenarios (ADN-A y ADN-B), de 2,5 a 2,6 kb. El ADN-A puede replicarse de forma independiente y formar viriones, pero el sistema infectivo requiere del ADN-B. Suelen compartir unas 200 bases de secuencia, que incluye el origen de replicación. El ADN-A codifica una proteína de la cápside (ORF AV1, CP), una proteína de movimiento (ORF AV2, MP), una proteína asociada a la replicación (ORF AC1, Rep), un activador transcripcional (ORF AC2, TrAP), un potenciador de la replicación (ORF AC3, REn) y la proteína C4 (ORF AC4, C4). El ADN-B codifica una proteína de transporte nuclear (ORF BV1, NSP) y una proteína de movimiento (ORF BC1, MP). Por otro lado, los genomas de los begomovirus monopartitos tienen mucho parecido con el ADN-A de los begomovirus bipartitos (Fiallo-Olivé & Navas-Castillo, 2023; Quazi M. I. Haq et al., 2023; Rojas et al., 2005).

A diferencia de la mayoría de los geminivirus transmitidos por la mosca blanca, cuyos genomas son bipartitos, los de los virus asociados al TYLCD son monopartitos. Existen excepciones, como el *Tomato yellow leaf curl Thailand virus* (TYLCTHV) y el *Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi* (TYLCKaV), cuyos genomas sí que son bipartitos. Los monopartitos poseen una única molécula de ADN monocatenario circular genómico (ssDNA) de 2.8 kb. Este ADN codifica seis marcos de lectura abierta (ORFs) que se organizan de manera bidireccional en dos unidades transcripcionales separadas por una región intergénica de unos 300 nucleótidos (Díaz-Pendón et al., 2010).

De los seis ORF, dos están en la cadena de sentido del virus, que codifica la proteína de la cápside CP (ORF V1) y una proteína similar al movimiento MP (ORF V2), y cuatro están en la cadena antisentido, codificando una proteína asociada a la replicación Rep (ORF C1), una proteína activadora de la transcripción TrAP (ORF C2), una proteína potenciadora de la replicación REn (ORF C3) y la proteína C4 (ORF C4) (Jupin et al., 1994; Wartig et al., 1997).

Los criterios establecidos por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) establecen un umbral de identidad de nucleótidos del 89% entre las secuencias completas de nucleótidos del ADN-A (Fauquet & Stanley, 2005). De acuerdo a esto, dentro del género de los begomovirus se han aceptado trece especies causantes del TYLCD (Yan et al., 2021): *Tomato yellow leaf curl Axarquia virus* (TYLCAxV), *Tomato yellow leaf curl China virus* (TYLCCNV), *Tomato yellow leaf curl Guandong virus* (TYLCCGuV), *Tomato yellow leaf curl Indonesia virus* (TYLCCIDV), *Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus* (TYLCKaV), *Tomato*

yellow leaf curl Malaga virus (TYLCMaV), *Tomato yellow leaf curl Mali virus* (TYLCMLV), *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV), *Tomato yellow leaf curl Thailand virus* (TYLCTHV), *Tomato yellow leaf curl Vietnam virus* (TYLCVNV), *Tomato yellow leaf curl Shuangbai virus* (TYLCShV), *Tomato yellow leaf curl Yunnan virus* (TYLCYnV) y el *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV).

Además, en el año 1999 se reportó la presencia en el sur de España de un recombinante entre los aislados TYLCSV – ES[1] y TYLCV – [ES72/97], que correspondió a ser el TYLCMaV (Monci et al., 2002). Otro recombinante de interés es el TYLCAxV, el cual proviene de la recombinación entre el TYLCV-[Alm] y el TYLCSV-ES [1] (García-Andrés et al., 2006). Estos casos pueden servir como ejemplo de la gran importancia que tiene la recombinación, puesto que contribuye a la diversificación genética de los geminivirus, pudiendo ocurrir a nivel de cepa, especie, género y familia (Monci et al., 2002).

1.5.3. Virus del rizado amarillo del tomate (Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV)

Hasta el año 1991, no se obtuvieron los primeros datos moleculares sobre el agente viral asociado con el TYLCD, que fue nombrado como *Tomato yellow leaf curl virus – Israel* (TYLCV-IL). Posteriormente, se clonó otra cepa asociada a infecciones por TYLCD, nombrada como *Tomato yellow leaf curl – Mild* (TYLCV-Mld). Desde entonces, han sido secuenciados y caracterizados molecularmente diferentes genomas virales asociados con el TYLCD (Pérfarres et al., 2012). Aunque TYLCD se puede encontrar por todo el mundo, únicamente estas dos cepas son los verdaderos agentes globales que causan la enfermedad. Otros begomovirus asociados con el TYLCD se han encontrado solo en regiones restringidas, como el TYLCCNV y el TYLCSV, limitadas a China y a los países mediterráneos, respectivamente (Yan et al., 2021).

Debido a la incidencia del virus en la cuenca del Mediterráneo y en el Medio Oriente, se estudió si alguna de ellas era el centro de origen de los virus. Mediante análisis de recombinación, se obtuvo que probablemente el primer TYLCV surgió en el Medio Oriente entre 1930 y 1950, y que la propagación al resto de países del mundo fue a partir de la aparición de TYLCV-Mld y TYLCV-IL. Irán y las regiones que lo rodean se consideran los centros más probables de diversificación del virus, mientras que la cuenca del Mediterráneo se caracteriza por ser la principal zona de movimiento global del TYLCV y la fuente directa de las variantes que van surgiendo (Fauquet et al., 2005; Pérfarres et al., 2012).

Las especies de begomovirus, como el TYLCV, tal y como se ha comentado anteriormente, poseen un genoma de ADN monocatenario, circular y monopartito de unas 2.8 kb, encapsidado en una partícula icosaédrica (Pérez-Padilla et al., 2020). Además, el TYLCV, a pesar de ser

mayoritariamente conocido por ser un patógeno del tomate, también puede infectar a otros cultivos de plantas como la judía (*Phaseolus vulgaris* L.), el lisianthus (*Eustoma grandiflorum* [Raf.] Shinn), el pimiento dulce (*Capsicum annum* L.), el pimiento picante (*C. chinens* Jacq.) y el tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), entre otros (Shirazi et al., 2014).

1.5.4. Mecanismos de transmisión de TYLCV

Los begomovirus como el TYLCV son adquiridos por moscas blancas como *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). Lo hacen a través del floema de la planta en forma de viriones que pasan a lo largo del canal alimentario hasta llegar al esófago. Posteriormente los viriones son transportados a través de la pared intestinal hasta el hemocele y desde allí llegan a las glándulas salivales. Finalmente se excreta con la saliva durante la alimentación, transmitiéndose la enfermedad a nuevas plantas (Ghanim et al., 2001).

La proteína de la cápside, CP, es el único factor que interactúa directamente con los factores de la mosca blanca durante la transmisión circulatoria del virus. Muchos insectos que se alimentan del floema, como *B. tabaci*, albergan endosimbiontes para completar su dieta. Estas bacterias endosimbióticas producen un homólogo de la chaperona GroEL la cual se ha identificado como la responsable de la interacción con la proteína CP del virus y consecuentemente, de su protección frente a la degradación (Kliot & Ghanim, 2013).

La agroinoculación se ha convertido, por otro lado, en la herramienta preferida para los estudios de las interacciones planta-virus debido a que la falta de transmisión mecánica de este virus es una limitación experimental importante. La mayoría de los begomovirus se transmiten solo a través de la mosca blanca, y la agroinoculación es una manera de simplificar en gran medida el estudio de estos virus (Elmer et al., 1988; Koeda et al., 2017).

En condiciones de campo al aire libre, el entorno fluctuante y la infección con otros virus dificultan la evaluación de la respuesta, existiendo además una amenaza de que la mosca blanca escape en el espacio cerrado de un laboratorio. La agroinoculación, en cambio, puede ser realizada en condiciones controladas de laboratorio utilizando plántulas pequeñas, lo que permite una evaluación precisa en un corto periodo de tiempo y en un espacio reducido (Koeda et al., 2017). En concreto, la agroinoculación ha sido muy exitosa en discos de hoja, semillas germinativas y plantas enteras, siendo la agroinoculación de los discos de hoja el método más rápido y simple para estudiar las funciones y mecanismos de resistencia viral (Picó et al., 2001).

1.5.5. Sintomatología

Los síntomas de la enfermedad se manifiestan de formas diferentes dependiendo de la etapa de crecimiento de la planta en el momento inicial de la infección, las condiciones ambientales y las variedades/cultivares de plantas de tomate (Khan et al., 2013). Causa una amplia gama de

síntomas, siendo los más típicos el amarillamiento marginal y la clorosis en el margen de las hojas más nuevas, curvatura ascendente de las hojas, reducción del tamaño de las hojas con arrugamiento, acortamiento de los entrenudos resultando en una apariencia enana y frondosa, y atrofia del crecimiento de las plantas. Los brotes son erectos y los folíolos más pequeños y deformes. Los folíolos que aparecen tras la infección se curvan hacia abajo y hacia adentro, al contrario de las hojas que se desarrollan posteriormente, que son cloróticas y con una curvatura ascendente (Figura 3).

Los síntomas producidos por la enfermedad suelen aparecer de dos a tres semanas después de la infección (Lapidot, 2007). Otros síntomas que se observan es el marchitamiento de las flores, y su abscisión, lo que consecuentemente produce un gran impacto negativo en la producción de tomate cuando la infección es en etapas tempranas (Khan et al., 2013). No hay síntomas notorios en los frutos de plantas infectadas tardíamente, los más notables son cuando la infección se produce en etapas tempranas. La mayoría (hasta el 90%) de las flores se desprenden tras la infección, por lo que los tomates se ven más afectados cuando la infección ocurre antes de la etapa de floración.



Figura 3. Síntomas característicos de la enfermedad causados por el TYLCV en plantas de tomate.

1.5.6. Mejora genética

Para prevenir que los virus infecten a la planta huésped, se pueden plantear diferentes estrategias, tales como controlar los insectos vectores mediante las barreras físicas apropiadas (trampas y mallas) y el uso de agentes químicos, como insecticidas. Sin embargo, la creación de obstáculos físicos no siempre es viable y el uso de compuestos químicos puede generar resistencia en las moscas blancas contra esas sustancias (Ji, Scott, et al., 2007; Luo et al., 2010).

La estrategia más efectiva para proteger los cultivos es mediante la introducción de resistencia frente a los virus y/o los insectos vectores. En el caso concreto del TYLCV, el método más efectivo a largo plazo es la mejora genética de las variedades de tomate para aumentar su resistencia al virus, destacando el uso de genes de resistencia procedentes de especies silvestres relacionadas con el de tomate (Yan et al., 2021).

La situación existente en el denominado Viejo Mundo, que incluye la región mediterránea, el Medio Oriente, el norte de África, África central y el sudeste asiático, es grave por las elevadas pérdidas económicas que existen, ya que la mayoría de los cultivos comerciales siguen sin ser inmunes a la enfermedad. En el Nuevo Mundo, hasta ahora, las estrategias se han basado principalmente en el empleo de pesticidas y de variedades híbridas de tomate importadas del Viejo Mundo. Se ha realizado un gran esfuerzo para obtener cultivares de tomate resistentes al TYLCV, siendo uno de los principales problemas la gran diversidad de begomovirus. Muchas veces también hay que realizar hibridación interespecífica y recuperar los rasgos agronómicos de los cultivares de tomate susceptibles para satisfacer las preferencias del consumidor (Ji, Scott, et al., 2007; Morales, 2001). No obstante, este método ha demostrado ser el más sostenible de los mencionados, algo también muy importante si tenemos en cuenta los Objetivos de Desarrollo Sostenibles (ODS) (Naciones Unidas, 2022).

Por tanto, la búsqueda e introgresión de genes de resistencia es de fundamental importancia para abordar esta enfermedad y minimizar los daños económicos y medioambientales que derivan de su tratamiento.

1.5.7. Genes de resistencia

Las plantas han desarrollado mecanismos eficientes para evitar la infección o para desarrollar respuestas que las hagan resistentes cuando son atacadas por un patógeno. Uno de los mecanismos de defensa más estudiados se basa en la resistencia gen-por-gen, mediante el cual las plantas que albergan genes específicos de resistencia (R) reconocen específicamente a los patógenos que llevan genes de avirulencia (Avr) correspondientes (Takken & Joosten, 2000).

Hasta la fecha, no se ha encontrado resistencia a TYLCV en el germoplasma de *S. lycopersicum*, pero sí que se han identificado genes de resistencia procedentes de especies silvestres relacionadas con el tomate, tales como *S. chilense*, *S. habrochaites*, *S. peruvianum*, *S. cheesmania* y *S. pimpinellifolium*. En total, se han identificado seis genes de resistencia a TYLCV: *Ty-1*, *Ty-2*, *Ty-3*, *Ty-4*, *ty-5* y *Ty-6*. Todos ellos han sido mapeados (Ji et al., 2009; Yan et al., 2021).

El gen *Ty-1*, proveniente de la accesión LA1969 de *S. chilense* fue el primer locus mapeado de resistencia a TYLCV por Zamir et al. (1994) en la región pericentromérica del cromosoma 6, entre los marcadores RFLP TG297 y TG97. Estudios posteriores, comprobaron la vinculación entre *Ty-1* con el marcador CT21, que se encuentra en el brazo largo de dicho cromosoma (Pérez de Castro et al., 2007). Posteriormente, Verlaan et al. (2011) demostraron que *Ty-1* se encuentra ubicado en el brazo largo del cromosoma 6 del tomate, cerca de la región cromosómica donde se encuentra mapeado *Ty-3*.

El gen *Ty-3* se identificó en las accesiones LA1932, LA2779 y LA1938 de *S. chilense*, y fue mapeado por primera vez en el cromosoma 6, a 15 cM del gen *Ty-1*. Es capaz de conferir resistencia tanto contra el TYLCV como con el *Tomato mottle virus* (ToMoV). Debido a la cercanía de ambos genes de resistencia, se planteó la posibilidad de que fuesen alélicos (Ji et al., 2007). Posteriormente, se demostró que efectivamente *Ty-1* y *Ty-3* son alelos del mismo gen, y codifican ARN polimerasas dependientes de ARN (RDR), sin ninguna función descrita en aquel momento (Verlaan et al., 2013). En concreto, pertenecen a un tipo RDR γ , que presenta homología con los genes RDR3, RDR4 y RDR5 de *Arabidopsis thaliana*. Posteriormente, se ha identificado que las plantas que poseen estos genes producen niveles elevados de sRNAs, enriquecidos en las regiones C3 y V1 (CP) del genoma viral. Estos sRNAs inducen la hipermetilación de citosina de su región promotora, proporcionando resistencia al virus mediante un mecanismo de silenciamiento génico transcripcional (TGS) (Butterbach et al., 2014).

El gen *Ty-2* fue identificado por Hanson et al. (2000) en la línea resistente de tomate H24, proveniente de la accesión B6013 de *S. habrochaites* f. *glabratum*. El gen se encuentra en el final del brazo largo del cromosoma 11 (Barbieri et al., 2010) en un intervalo de 4,5 cM (Ji et al., 2009). En un principio, se dudó sobre la totalidad de la dominancia de la resistencia (Hanson et al., 2000), confirmándose posteriormente una resistencia total (Ji et al., 2009). Es usado en mejora, pero no es efectivo contra un gran número de cepas de TYLCV (El-Sappah et al., 2022). Confiere resistencia a la cepa de Israel (TYLCV-IL), pero no a otros agentes causales del TYLCV, como el TYLCSV o la cepa TYLCV-Mld (Shen et al., 2020).

La resistencia mediada por el gen *Ty-4* fue identificada en la accesión LA1932 de *S. chilense*, en el brazo largo del cromosoma 3 (Ji et al., 2009). Sin embargo, este gen confiere una menor resistencia a la enfermedad.

El gen *ty-5* fue identificado en la línea de tomate TY172 (Anbinder et al., 2009), que descende de cuatro accesiones de *S. peruvianum* (PI126926, PI126930, PI390681 y LA0441) (Friedmann et al., 1998). Esta resistencia está controlada por un QTL mayor en el cromosoma 4, es recesiva y presenta una alta asociación con SINAC1, un gen que codifica proteínas NAC1.

Estas proteínas están implicadas en la replicación del begomovirus ToLCV al interactuar con la proteína de replicación viral REN, al igual que ocurre con el TYLCV. Sin embargo, el gen que controla la resistencia en el locus *Ty-5* es conocido como *Pelota* (Anbinder et al., 2009; Ren et al., 2022; Wang et al., 2018), el cual participa en el reciclaje de los ribosomas durante la síntesis de proteínas. El *Ty-5* es un alelo con pérdida de función de dicha proteína, puesto que presenta una mutación específica que dificulta la multiplicación del TYLCV (Lapidot et al., 2015).

Recientemente, se ha identificado otro gen de resistencia, el *Ty-6*, concretamente en el brazo largo del cromosoma 10, derivado de las accesiones LA1938 y LA2779 de *S. chilense* (Hutton et al., 2012). La identificación de *Ty-6* es un hallazgo importante, no solo porque amplía el conjunto de genes *Ty* disponibles para los mejoradores, sino también porque confiere resistencia tanto a los begomovirus monopartitos como bipartitos (TYLCV y ToMoV, respectivamente). Sin embargo, no se ha encontrado todavía un marcador que se encuentre fuertemente ligado a este gen (Gill et al., 2019).

En general, el *Ty-1* presenta dominancia para la resistencia a TYLCV, pero es ineficaz contra algunas de sus cepas y contra otros begomovirus bipartitos. Además, este gen no es efectivo bajo condiciones de alta presión del virus. El *Ty-3* muestra menos dominancia, pero resistencia ante un mayor número de cepas de TYLCV (Verlaan et al., 2011). La combinación de ambos (*Ty-1/Ty-3*) es la más utilizada en muchos programas de mejora a nivel mundial (Yan et al., 2021), estando presente en la mayoría de híbridos comerciales (Yan et al., 2021). Es también importante el *Ty-2*, pero puede ser superado por TYLCSV y TYLCV-Mld. Todos estos aspectos facilitan la existencia de epidemias de TYLCV, lo cual sigue haciendo necesario la búsqueda de fuentes de resistencia en especies silvestres relacionadas con el tomate (Yan et al., 2018).

1.6. Variedades tradicionales de tomate: susceptibilidad a virosis y resistencia genética

El tomate llegó a España, probablemente, a través del conquistador español Cortés, que introdujo un pequeño tomate amarillo en 1521. A continuación, pasó a Italia a través de Nápoles, bajo dominio español en aquel siglo. Mientras que en el norte de Europa se evitó el consumo del tomate por su parecido a la belladona y a la mandrágora, en España y en Italia se incluyó este producto en la dieta muy pronto, puesto que hay documentos que así lo certifican en el siglo XVI (Bergougnoux, 2014). Considerando que el tomate se difundió desde España al resto de Europa con el paso del tiempo, es en nuestro país (junto a su área de domesticación en Mesoamérica), donde mayor cantidad de ecotipos y variedades tradicionales se han desarrollado adaptadas a diferentes condiciones climáticas.

Con la tendencia a explotaciones en monocultivo enfocadas a maximizar el rendimiento se ha reducido en gran cantidad el cultivo de las variedades tradicionales de tomate, que se caracterizan por ser menos productivas y más susceptibles a enfermedades. Esto ha provocado que durante mucho tiempo no se haya realizado mejora en estas variedades tradicionales, que muchas veces presentan grandes cualidades organolépticas y de adaptación a áreas geográficas concretas (Cebolla-Cornejo et al., 2007). Por tanto, estas variedades pueden ser una opción excelente a la hora de diferenciarse de otros mercados más comunes, a la vez que se conserva la diversidad genética tradicional. Sin embargo, un aspecto a tratar con urgencia es la mejora de la productividad y la resistencia a enfermedades, puesto que los híbridos comerciales son mucho más competitivos en esos aspectos.

La Universidad Miguel Hernández (UMH) comenzó en el 1998 un programa para mejorar variedades tradicionales de tomate, con el objetivo de introgresar genes de resistencia en las variedades “Muchamiel” y “De la Pera”, permitiéndolas competir con los híbridos (Pérez-Caselles et al., 2020). Estas variedades son muy típicas de la provincia de Alicante, donde se venden en mercados locales a un precio seis veces mayor que el de las variedades híbridas. El tomate “De la Pera” se usa para la mesa y para conservas, caracterizándose por ser un fruto consistente, de carne duro y sin vacío interior. Su forma es elipsoide, con un peso medio de unos 80-100 gramos, con ausencia de hombros verdes y agrietado. En lo referente al tomate “Muchamiel”, se destina al consumo en fresco, siendo el mejor tomate que se puede encontrar en invierno. Se caracteriza por tener marcadas costillas, hombros intensos y un ligero agrietado, siendo una variedad tardía. Tiene una forma ligeramente allanada, con un peso algo mayor, de entre 180 y 275 gramos (Generalitat Valenciana, 2016).

En concreto, mediante retrocruzamientos y selección asistida por marcadores (MAS), se procedió a introducir, además del *Ty-1*, los genes de resistencia *Tm-2^a* y *Sw-5*, que proporcionan resistencia al virus del mosaico del tomate (ToMV) y al virus del bronceado del tomate (TSWV), respectivamente (Carbonell et al., 2018).

2. OBJETIVOS

El Departamento de Biología Aplicada de la Universidad Miguel Hernández de Elche, dispone de líneas de mejora de las variedades tradicionales de tomate “Muchamiel” y “De la Pera” portadoras de los genes de resistencia *Ty-1*, *Sw5* y *Tm-2^a*, que confieren resistencia al virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV), al virus del bronceado del tomate (TSWV) y al virus del mosaico del tomate (ToMV), respectivamente. En este contexto, el objetivo de este trabajo es la evaluación de la resistencia a TYLCV en materiales derivados de estas líneas. En concreto, se han evaluado híbridos procedentes del cruce con diferentes variedades tradicionales, retrocruces hacia diferentes variedades tradicionales desarrolladas utilizando

como parental donante la variedad “Muchamiel” portadora de resistencia, y materiales recombinantes en el fondo de la variedad “Muchamiel”, que incorporan el alelo de resistencia.

Para la evaluación de dicha resistencia en las líneas portadoras del gen *Ty-1* se realizará una valoración visual de los síntomas a diferentes días tras la agroinoculación, así como una determinación de la acumulación viral mediante PCR cuantitativa.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal

El material utilizado en el trabajo fue desarrollado por el Departamento de Biología Aplicada de la Universidad Miguel Hernández de Orihuela (Tabla 3). Se basa, fundamentalmente, en el uso de las variedades “Muchamiel” y “De la Pera”, muy apreciadas en el sureste español por su gran calidad organoléptica. Sin embargo, se trata de variedades amenazadas por su susceptibilidad a virus como el ToMV, TSWV y TYLCV. El grupo de la UMH ha trabajado en el desarrollo de diferentes líneas con distintas combinaciones de genes de resistencia a estas virosis, *Tm-2^a*, *Sw5* y *Ty-1*, respectivamente (García-Martínez et al., 2014). Para ello, se ha utilizado diferente material portador de distintas combinaciones de los alelos de resistencia en ambas variedades.

En el caso de la variedad “Muchamiel”, se dispone de una línea de mejora UMH 1200, homocigota para los tres genes de resistencia. Esta línea fue obtenida mediante el cruce inicial de la accesión M18 (“Muchamiel”) con el híbrido Anastasia (parental donante de los alelos de resistencia), y posterior fijación en homocigosis dichos alelos mediante cinco ciclos de retrocruzamiento hacia la variedad “Muchamiel” (García-Martínez et al., 2011). La línea Muchamiel 929 es similar a la anterior, portadora del gen *Ty-1*, pero no de los genes de resistencia a ToMV y TSWV.

En cuanto a la variedad “De la Pera”, se disponía de una línea denominada 1458, portadora también únicamente del alelo de resistencia *Ty-1* en homocigosis (Santiago García-Martínez, comunicación personal).

En lo referente a los controles susceptibles a TYLCV, se empleó la línea de mejora UMH 1354, de tipo “De la Pera” y desarrollada por el mismo departamento tras el cruce de la accesión P21 con el híbrido comercial Anastasia, realizando posteriormente seis generaciones de retrocruzamiento (García-Martínez et al., 2016). También emplearon material tradicional “De la Pera”, y de una variedad tradicional de tipo pimiento.

Tabla 3. Genotipos utilizados en el desarrollo del trabajo, así como su combinación de alelos para los genes de resistencia a ToMV, TSWV y TYLCV.

GENOTIPOS	LÍNEAS DE MEJORA	NOMBRE	COMBINACIÓN DE ALELOS PARA LOS GENES DE RESISTENCIA Tm2 ^a / Sw-5 / Ty-1
Control resistente a TYLCV	Muchamiel	UMH 1200	RR / RR / RR
	Muchamiel	929	ss / ss / RR
	De la Pera	1458	ss / ss / RR
Control susceptible a TYLCV	Tipo pimiento	PI20B	ss / ss / ss
	De la Pera	UMH 1354	RR / RR / ss
	De la Pera	2A	ss / ss / ss
Variedades F1	De la Pera x Moruno	1200 x 12A	Rs/ Rs / Rs
	De la Pera x Muchamiel	1200 x 3A	Rs /Rs / Rs
	De la Pera X De la Pera	1406 x 2A	Rs/ Rs / Rs
	De la Pera x De la Pera	1354 x 2A	ss / ss / ss
	Muchamiel x Muchamiel	1139 x 3A	ss / ss / ss
	Rosa x Rosa	MR1 x 1A	ss / ss / ss
Retrocruzamientos	Muchamiel x Flor de Baladre	BC4-FB127A	-- / -- / Rs
	Muchamiel x Tipo pimiento	BC4-PI10B	-- / -- / Rs
	Muchamiel x Tipo pimiento	BC4-PI20B	-- / -- / Rs
	Muchamiel x Rosa de Altea	BC4-RA*	-- / -- / Rs
	Muchamiel x Flor de Baladre	BC4-FB9A *	-- / -- / Rs
	Muchamiel x Tomate Redondo	BC5-6348 *	-- / -- / Rs
	Muchamiel x Tomate Redondo	BC6-644 *	-- / -- / Rs
Recombinantes	Muchamiel	Much162TT	ss / ss / RR
		Much192TT	ss / ss / RR
		Much168TT	ss/ ss / RR
		Much534TT	ss/ ss / RR

*Retrocruces derivados de una línea con fondo “Muchamiel” con una introgresión de tamaño reducido (ver texto para ver la descripción).

Entre los materiales evaluados, se disponía de seis híbridos obtenidos tras el cruce de diferentes variedades tradicionales portadoras de distintas combinaciones de genes de resistencia y variedades susceptibles (Tabla 3). En cuanto a los materiales obtenidos por

retrocruzamiento, se disponía de materiales de cuarta, quinta y hasta sexta generación de retrocruce, derivadas de dos líneas de “Muchamiel”: un recombinante con una introgresión de la región del alelo *Ty-1* de alrededor 3Mb y la línea UMH1200, que presenta en el cromosoma 6 una introgresión de casi 35 Mb (Domingo, 2018). Estas líneas se cruzaron con distintos materiales tradicionales, como son “Flor de Baladre” y “Rosa de Altea”, entre otras, con el objetivo de introgresar la resistencia en estos fondos. Se evaluaron fundamentalmente plantas de estas generaciones portadoras del gen *Ty-1* en heterocigosis, si bien se incluyó también una generación con plantas no portadoras de resistencia a TYLCV. En estos materiales no se confirmó el genotipo para los genes de resistencia a ToMV y TSWV.

Por último, se evaluaron también cuatro recombinantes diferentes, con introgresiones de alrededor de 3 Mb para la región del *Ty-1*, obtenidos en el proyecto europeo TRADITOM (Santiago García-Martínez, comunicación personal).

3.2. Condiciones de cultivo

Las semillas fueron sometidas a un proceso de desinfección con lejía comercial al 30% durante cinco minutos como paso previo a la siembra. Transcurrido ese tiempo, se realizaron tres levados de cinco minutos cada uno con agua destilada. Tras ser sometidas a ese proceso, se les realizó también un tratamiento de termoterapia antes de ponerlas a germinar, durante un día y medio a 75 °C en una estufa.

Después de esterilizar las semillas, se sembraron en placas de Petri. Cada placa contenía algodón y papel absorbente humedecidos con agua destilada. Una vez sembradas, las placas se colocaron en un fitotrón a 24 °C, con una humedad del 70% y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

Diez días después de la siembra, las plántulas emergidas se trasplantaron a macetas de 7 x 7 x 8 cm con turba como sustrato. Luego, se volvieron a colocar en el fitotrón, asegurándose siempre de que el sustrato estuviera bien hidratado.

3.3. Inoculación

La inoculación de las plantas con el virus TYLCV fue realizada siguiendo el método de agroinoculación (Kheyr-Pour et al., 1994). Se utilizó una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* transformada con la cepa TYLCV-IL, proporcionada por el Dr. Eduardo Rodríguez Bejarano, de la Universidad de Málaga. Las bacterias fueron cultivadas en el medio LB Broth, previamente esterilizado en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Posteriormente, se le añadió kanamicina esterilizada por filtración (100 mg/L) y el cultivo se mantuvo en agitación durante 48h a 180 rpm, 26 °C y sin luz.

A continuación, el contenido de los matraces se distribuyó en tubos Falcon de 15 mL, que se centrifugaron a 4600 rpm durante 20 minutos para precipitar las bacterias que habían crecido. El sobrenadante se desechó y las bacterias se resuspendieron en 1 mL de agua destilada.

La inoculación fue realizada cuando las plantas presentaban unas 3-4 hojas verdaderas, inyectando el cultivo bacteriano obtenido en las axilas de las hojas que se encontraban más cerca del ápice (Figura 4).



Figura 4. Inoculación mediante inyección en las axilas de las plántulas de tomate.

3.4. Seguimiento de la enfermedad

3.4.1. Evaluación visual de síntomas

La evaluación de los síntomas de la enfermedad se realizó a los 7, 14, 21 y 28 días después de la inoculación. Para ello, se empleó el índice de severidad de la enfermedad (DSI, “Disease Severity Index”), basado en una escala que va del 0 al 4 (Friedmann et al., 1998).

0: ningún síntoma visible, las plantas inoculadas muestran el mismo crecimiento y desarrollo que las plantas no inoculadas.

1: muy ligero amarillamiento de los márgenes foliares de la hoja apical.

2: algo de amarillamiento y ligero encrespamiento de los extremos foliares.

3: gran cantidad de amarillamiento, encrespamiento y acucharado, con algo de reducción en el tamaño, aunque continua el desarrollo de las plantas.

4: grave deterioro de la planta y amarilleamiento, encrespamiento y acucharado pronunciado en las hojas, la planta detiene su crecimiento.

Se utilizaron valores intermedios para reflejar de forma precisa los síntomas observados.

3.4.2. Detección del ADN viral

Para la detección del ADN se procedió a la extracción del ADN genómico de los diferentes materiales empleados utilizando el método CTAB. Para ello, lo primero que se hizo fue preparar tubos Eppendorf de 2 ml con una bola de plástico en su interior y coger de cada planta dos discos de Eppendorf de su tejido vegetal (50-75 mg), que fueron congelados posteriormente en nitrógeno líquido para conservarlos.

El tejido congelado se trituró con un homogeneizador y se le añadió a cada tubo 700 μ L del tampón de extracción, CTAB, junto a 1,4 μ L de β -mercaptoetanol, agitando los tubos para homogenizar la mezcla. A continuación, las muestras se incubaron durante unos 30 minutos a una temperatura de 65 °C. Tras la finalización de dicho período de tiempo, se procedió a añadir a cada una de las muestras 100 μ L de cloroformo – alcohol isoamílico (24:1), y de nuevo se agitaron las muestras para homogenizar. Tras este paso, se procedió a la primera centrifugación del método, durante 5 minutos y a 11.000 rpm.

Tras la finalización de la centrifugación, se procedió a recuperar la fase acuosa de cada tubo (aproximadamente 500 μ L) y se añadió a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 ml. En ese mismo tubo, se adicionó un volumen igual al recuperado en la fase acuosa de isopropanol frío, y de nuevo se agitaron los tubos suavemente. A continuación, se pusieron las muestras en condiciones de -20 °C durante unos 10 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, los tubos fueron de nuevo sometidos a una centrifugación durante 5 minutos, pero esta vez a 13.000 rpm. Una vez pasado ese tiempo, se eliminó el sobrenadante con precaución para evitar perder el precipitado depositado en el fondo del tubo.

El siguiente paso fue lavar el ADN presente en cada tubo en forma de precipitado. Para ello, se hizo un lavado con 300 μ L de etanol 70%, resuspendiendo el pellet con un vórtex para mezclar bien el reactivo. Las muestras se sometieron a una última centrifugación de 5 minutos a 13.000 rpm y una vez finalizada, se eliminó de nuevo, con mucho cuidado, el sobrenadante de los tubos. Por último, se dejaron secar los tubos con el pellet en su interior a temperatura ambiente, y una vez secos, se resuspendieron con 100 μ L de agua mili-Q.

La cuantificación de la carga viral de las muestras se realizó mediante la técnica de la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), utilizando el sistema LightCycler® 480. Para ello se utilizó un kit, el FastStart Essential DNA Green Master (Roche), y los cebadores descritos por Pérez-Padilla et al. (2020) para la detección del ADN viral. Así mismo, se utilizó como gen de referencia o gen control el de la citocromo oxidasa (gen COX), usando los cebadores descritos por Weller et al. (2000) (Tabla 4).

Tabla 4. Cebadores utilizados en la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) para detectar los virus asociados a la enfermedad del rizado amarillo del tomate y los genes citocromo oxidasa (COX) de las plantas.

Nombre del cebador	Secuencia del cebador (5'-3')
TYLCV-INIA-F	CCCCCTTTAATTTGAATGGGCTT
TYLCV-INIA-R	CATTGATGACGTAGACCCGCA
COX-F	CGTCGCATTCCAGATTATCCA
COX-R	CAACTACGGATATATAAGAGCCAAACTG

La reacción tuvo un volumen total de 15 μ L, de los cuales, 7,5 μ L correspondían al mix, 1,5 μ L a cada uno de los cebadores (10 μ M), 1,5 μ L al agua y 3 μ L de ADN a una concentración de 5 ng/ml. Las condiciones que se emplearon en la reacción llevada a cabo por el HRM fueron: un primer paso de desnaturalización a 95 °C durante 10 minutos; 40 ciclos de PCR (15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 65 °C y 1 minuto a 60 °C); un aumento de la temperatura gradual (15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C), seguido de un incremento de temperatura hasta alcanzar de nuevo los 95 °C. Para poder observar los resultados obtenidos se utilizó el programa de software asociado al Lightcycler® 480.

La acumulación relativa de TYLCV se estimó mediante el método comparativo Ct, utilizando la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta\Delta Ct$ es la diferencia entre el ΔCt de cada muestra (ΔCt muestra: Ct genes de referencia – Ct viral) y el ΔCt de la muestra calibradora (ΔCt calibradora). Se utilizó como muestra calibradora una línea resistente por placa (Livak & Schmittgen, 2001).

3.5. Genotipado mediante marcadores asociados al gen Ty-1.

Para confirmar la presencia del gen de resistencia a TYLCV se empleó un marcador molecular de tipo HRM. El genotipado fue llevado a cabo por el Departamento de Biología Aplicada de la Universidad Miguel Hernández (UMH) de Orihuela. El marcador ligado al gen *Ty-1* fue el marcador C4 (Tabla 5), diseñado por este grupo a partir de la secuencia flanqueante del marcador solcap_sl_snp_44625 (<https://solgenomics.net>).

Tabla 5. Marcador utilizado en el genotipado de las líneas evaluadas.

Marcador	Cebador	Secuencia (5'-3')
C4	C4-F	GCTATCATACGATCAGAGCATCA
	C4-R	GCATCAGAACTTCATTTGATTG

Las condiciones de la reacción PCR fueron puestas a punto por parte de este grupo de la UMH (Carbonell, 2021). Para llevarla a cabo se utilizó el equipo LightCycler® 480 de Roche. El volumen total empleado en la reacción para el marcador C4 fue de 10 μ L, 5 de los cuales

provenían del Master Mix 5x (incluye la AptaTaq Fast DNA Polimerasa, dNTPs, colorante intercalante del DNA y el tampón de mezcla); 1,2 µL fueron de MgCl₂ 25 mM, 0,2 µL de cada cebador 10 mM, 0,5 µL de ADN (15-30 ng/µL) y 2,9 µL de agua para llegar al volumen final.

Las condiciones de la reacción HRM consistieron en un primer paso de desnaturalización de 10 minutos a 95 °C. A continuación 45 ciclos de PCR (15 segundos a 95 °C, 15 segundos a 60 °C y un minuto a 72° C). Posteriormente, se produjo el aumento gradual de temperatura (etapa de *melting*) consistente en 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 40 °C y un incremento desde 60 °C hasta alcanzar los 95 °C. Para visualizar los datos se recurrió al software asociado a LightCycler® 480.

3.6. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa Statgraphics Centurion XVI. Los efectos de la inoculación de la cepa TYLCV-IL en los diferentes materiales utilizados se analizó mediante un análisis de la varianza simple seguido de una comparación de medias múltiple con la prueba post-hoc LSD.

4. RESULTADOS

La evaluación de la resistencia en los materiales ensayados se llevó a cabo mediante la valoración visual de los síntomas tras la agroinoculación con la cepa TYLCV-IL a los 7, 14, 21 y 28 días tras la inoculación. Así mismo, se cuantificó la carga viral presente en cada uno de los genotipos a los 14 y 28 dpi.

Se utilizaron tres controles resistentes y tres controles susceptibles en la evaluación de los tres tipos de materiales incluidos en el experimento (Tabla 3). Como controles resistentes, se emplearon las líneas UMH1200, 929 y 1458. Las dos primeras pertenecen a la variedad “Muchamiel”, con la diferencia de que la UMH1200, presenta resistencia a las tres enfermedades virales, mientras que la 929 solo presenta el alelo de resistencia *Ty-1* (ver apartado 3.1). En cuanto a la línea 1458, es de la variedad “De la Pera”, portadora de resistencia a TYLCV únicamente.

En el caso de los controles susceptibles, se emplearon las líneas PI20B, UMH 1354 y 2A. La primera de ellas es un tomate tipo pimiento proveniente del banco de germoplasma del IMIDA (BAGERIM). Las otras dos son de la variedad “De la Pera”, la primera con resistencia a ToMV y TSWV, y la segunda susceptible a las tres enfermedades.

4.1. EVALUACIÓN DE LOS HÍBRIDOS

A los 7 días de evaluación visual, no se observaron síntomas en ninguno de los controles ni en ninguno de los híbridos ensayados. Ninguno de los tres controles resistentes mostró síntomas

en ninguna de las fechas de evaluación visual (Figura 5). En cuanto a los controles susceptibles, los primeros síntomas aparecieron a los 14 dpi, siendo ya superiores en promedio a 3 en la escala de síntomas empleada en la línea PI20B. Ya en la fecha siguiente de evaluación, a los 21 dpi, los síntomas eran superiores a 2 en los tres controles susceptibles, agravándose a los 28 dpi, hasta el valor 4, el máximo valor en la escala de gravedad propuesta por Friedmann. Los síntomas que se observaban en las plantas de los controles susceptibles eran grave atrofia, cese de crecimiento, y un amarillamiento y acucharado muy pronunciados (Figura 5), algo que no se observaba en los híbridos resistentes y no en tanta medida en los híbridos susceptibles.



Figura 5. Síntomas observados en las plantas control con susceptibilidad a TYLCV a los 28 dpi.

Estas diferencias en la gravedad de los síntomas mostrados en las líneas carentes del alelo de resistencia *Ty-1* podrían deberse a diferencias en el fondo genético, puesto que cada híbrido procede del cruce de materiales muy distintos, o incluso al distinto vigor de las plantas que se inocularon con la cepa TYLCV-IL en un principio.

Se evaluaron seis híbridos diferentes (ver apartado 3.1, Tabla 3), siendo tres de ellos resistentes al TYLCV (1200 x 12A, 1200 x 3A y 1406 x 2A), y los otros tres susceptibles (1354 x 2A, 1139 x 3A y MR1 x 1A). A los 14 dpi en los seis casos se observaban síntomas leves: en todos los casos se asignó un valor de entre 0,5 y 1 en la escala empleada, puesto que se observaba un ligero acucharado de las hojas. No obstante, a partir de los 21 y 28 dpi los síntomas en los híbridos portadores con el alelo de resistencia prácticamente desaparecieron. En los tres híbridos susceptibles, los síntomas se agravaron para fechas posteriores, con valores comprendidos entre 2,5 y 3. Los síntomas observados fueron amarilleamiento y rizado de las hojas, lo que demostraba la susceptibilidad a la enfermedad. No se observaron diferencias

significativas entre los tres híbridos susceptibles. En cualquier caso, incluso a los 28 dpi los síntomas fueron significativamente inferiores a los observados en los controles susceptibles (Figura 6).

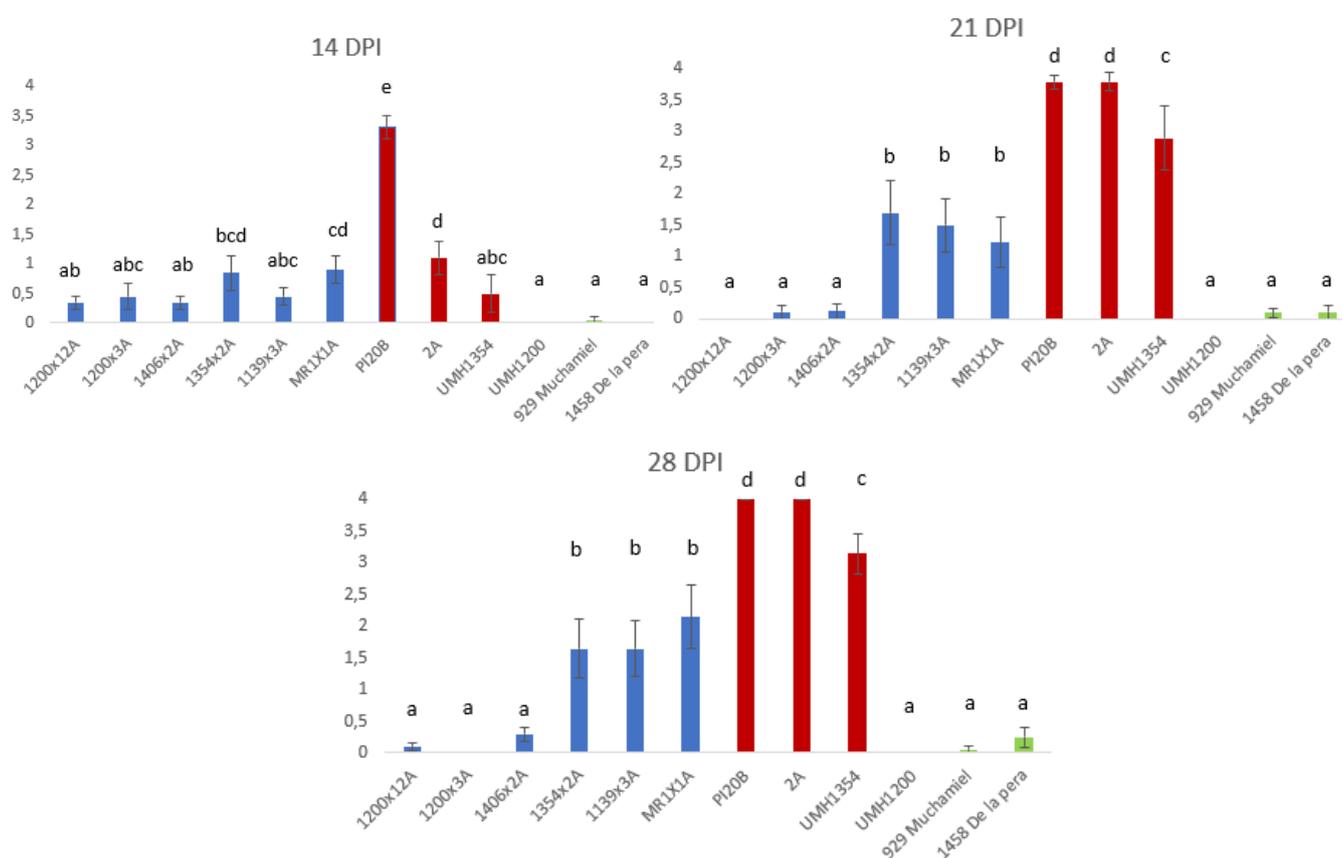


Figura 6. Promedio (\pm error estándar) de índices de gravedad de las líneas evaluadas a los 14, 21 y 28 días post inoculación (DPI). En azul, los híbridos; en rojo, los controles susceptibles; en verde, los controles resistentes. Letras distintas para los genotipos en cada fecha de muestreo indican diferencias significativas (test LSD, $p < 0,05$).

En el caso de la acumulación viral, se realizó la cuantificación a los 14 y 28 dpi. En la primera fecha, apenas se observó acumulación vírica en ninguno de los genotipos analizados, ni en los híbridos ni en ninguno de los controles, únicamente observándose diferencias significativas en el control susceptible PI20B (Figura 7). Transcurridos los 28 días de la inoculación se observa una mayor acumulación viral, tanto en los controles susceptibles como en los tres híbridos que también eran susceptibles. Sin embargo, solamente se encontraron diferencias significativas en el híbrido MR1x1A respecto a los híbridos resistentes, no habiendo diferencias significativas en la acumulación viral entre el resto de híbridos. Como se ha mencionado anteriormente, esto puede deberse al fondo genético de los diferentes materiales utilizados.

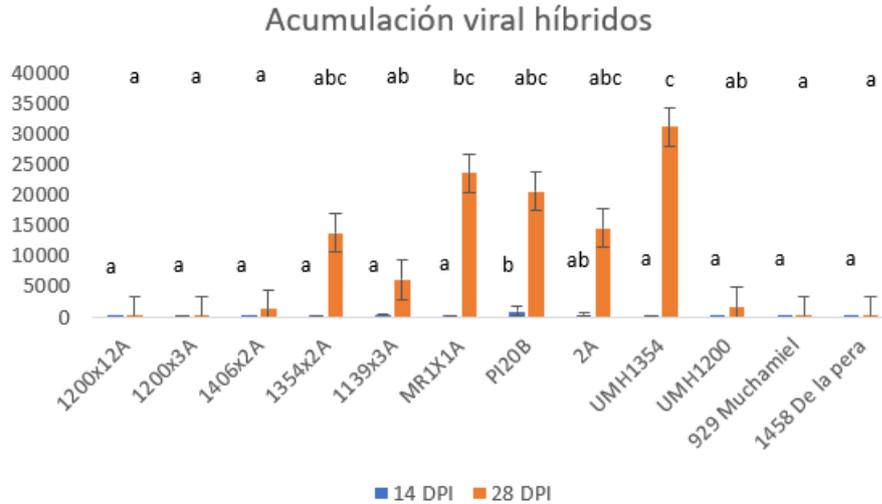


Figura 7. Promedio (\pm error estándar) de la acumulación relativa de ADN viral correspondiente a los 14 y 28 DPI en los híbridos expresada como $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Letras distintas para los genotipos en cada fecha de muestreo indican diferencias significativas (test LSD, $p < 0,05$).

4.2. EVALUACIÓN DE LOS RETROCRUCES

En el caso de los retrocruces, se han evaluado siete descendencias diferentes. Todas ellas presentan el alelo de resistencia *Ty-1* en heterocigosis, a excepción del retrocruce BC5-6348, en el que se evaluaron plantas portadoras del gen *Ty-1* en heterocigosis y también plantas homocigotas para el alelo que confiere susceptibilidad. De forma similar a lo indicado en el caso de los híbridos, no se observaron síntomas en la primera fecha de evaluación. A los 14 dpi, todos los retrocruces de la generación BC4 presentaban síntomas (valorados entre 0 y 1), siendo significativamente superiores en BC4-PI10B y BC4-PI20B con respecto a los de BC4-RA, BC4-FB9A y BC4-FB127A y. Por otro lado, el retrocruce de generación BC5 portador del *Ty-1* y el retrocruce de generación BC6 permanecieron asintomáticos a lo largo de todo el ensayo (Figura 8).

Se observó una disminución de síntomas, tanto a los 21 como a los 28 dpi en los retrocruces BC4. De hecho, no se observaron síntomas en ninguno de los retrocruces portadores del gen *Ty-1*. En el caso del retrocruce BC5-6348, del que se evaluaron plantas heterocigotas para el gen *Ty-1* y plantas homocigotas susceptibles, las plantas portadoras permanecieron asintomáticas, mientras que las susceptibles mostraron síntomas leves desde los 14 dpi. Sin embargo, como promedio los síntomas fueron inferiores a los encontrados en los controles susceptibles. De hecho, a los 28 dpi todas las plantas, excepto una, mostraron recuperación de

los síntomas. Una de las plantas permaneció asintomática a lo largo de todo el ensayo, pudiendo tratarse de un escape a la agroinoculación.

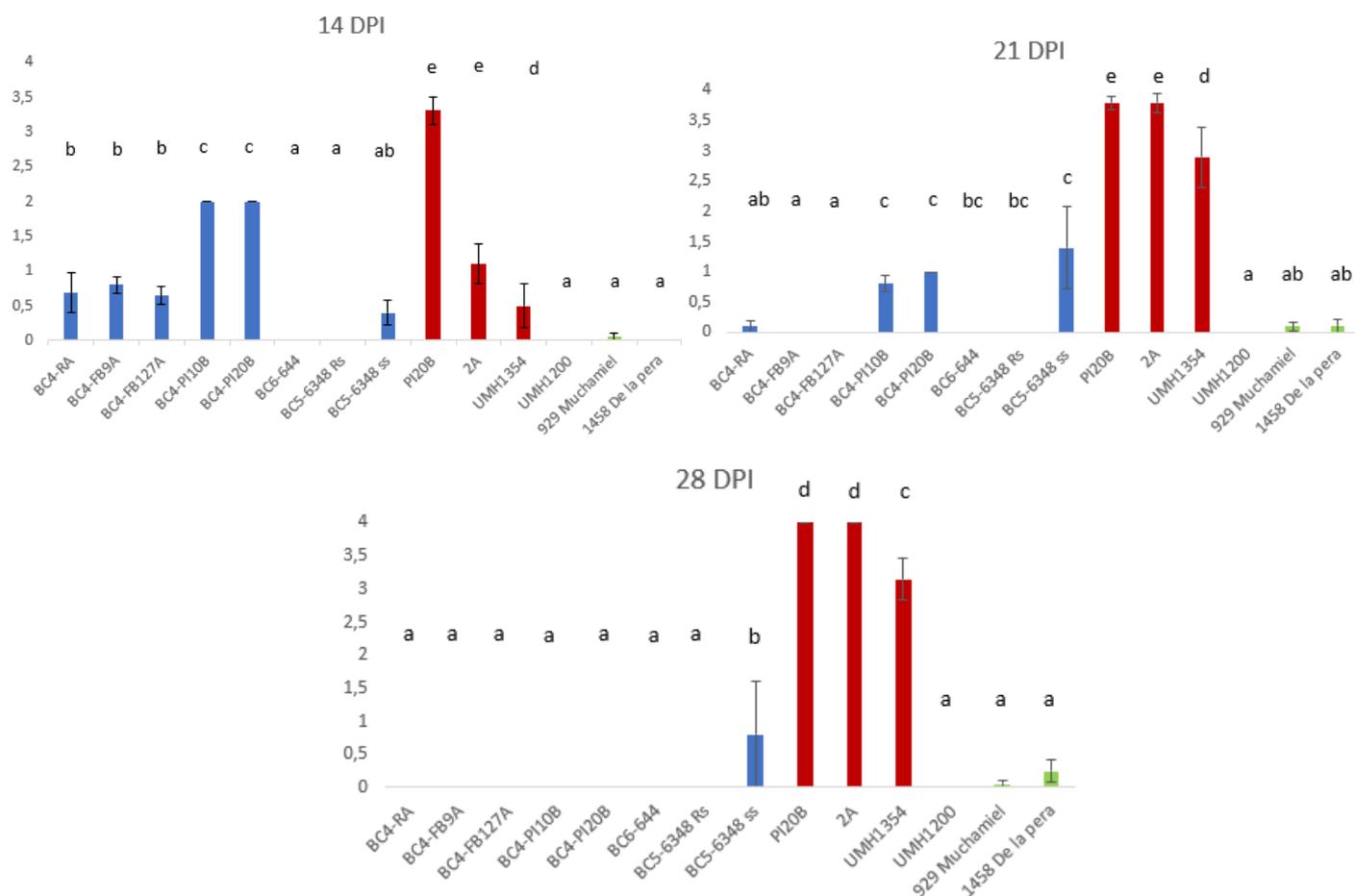


Figura 8. Promedio (\pm error estándar) de índices de gravedad de las líneas evaluadas a los 14, 21 y 28 días post inoculación (DPI). En azul, los retrocruces; en rojo, los controles susceptibles; en verde, los controles resistentes. Letras distintas para los genotipos en cada fecha de muestreo indican diferencias significativas (test LSD, $p < 0,05$).

La acumulación viral detectada a los 14 dpi fue muy baja en todos los genotipos ensayados, incluyendo los controles, no permitiendo discriminar entre genotipos resistentes y susceptibles (Figura 9). A los 30 dpi la acumulación viral en todos los retrocruces ensayados fue comparable a la observada en los controles resistentes e inferior a la detectada en los controles susceptibles (Figura 8). Se confirmó que la acumulación presente en el retrocruce susceptible BC5-6348 fue como promedio muy baja, significativamente inferior a la detectada en los controles susceptibles. Estos resultados parecen indicar que la agroinoculación no fue efectiva en este genotipo.

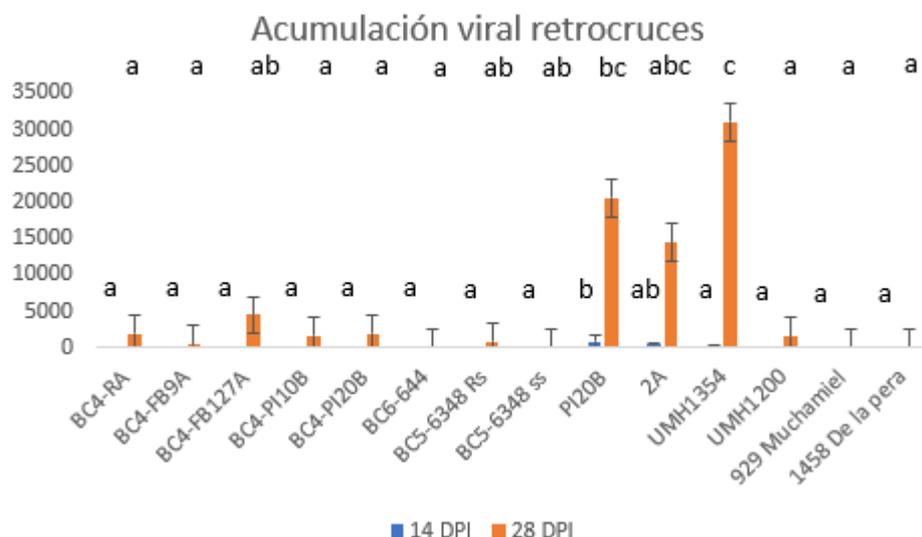


Figura 9. Promedio (\pm error estándar) de la acumulación relativa de ADN viral correspondiente a los 14 y 28 DPI en los retrocruces expresada como $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Letras distintas para los genotipos en cada fecha de muestreo indican diferencias significativas (test LSD, $p < 0,05$).

4.3. EVALUACIÓN DE LOS RECOMBINANTES

Por último, se evaluó la resistencia de cuatro recombinantes para la región del gen *Ty-1*. Todos ellos presentaban el gen *Ty-1* en homocigosis, tal y como se confirmó mediante marcadores moleculares.

A los 14 dpi para todos los recombinantes se identificaron plantas que presentaban síntomas ligeros, valorados entre 0,5 y 1,5, consistentes en un pequeño acucharado. A los 21 dpi muchas de las plantas se recuperaron y solo se veían ligeros síntomas en algunas plantas de los recombinantes 168TT y 534TT, no siendo significativamente superiores a los observados en los otros dos recombinantes (Figura 10). A los 28 dpi, se observaron síntomas en los recombinantes 192TT y 168TT, consistentes en cierto amarilleo de las hojas y algo de acucharado. Únicamente presenta diferencias significativas con respecto a los demás recombinantes este último. No obstante, en cualquier caso, los síntomas presentes fueron muy inferiores a los observados en los controles susceptibles.

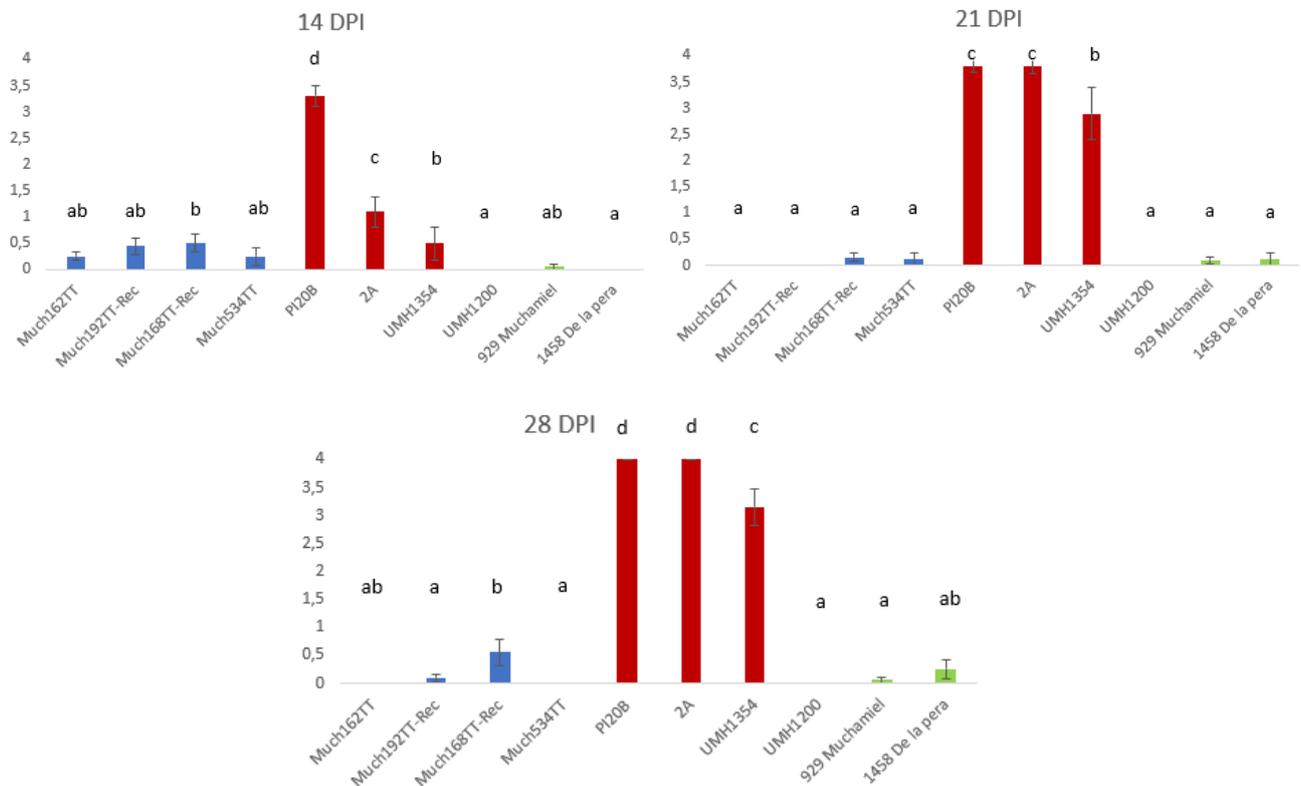


Figura 10. Promedio (\pm error estándar) de índices de gravedad de las líneas evaluadas a los 14, 21 y 28 días post inoculación (DPI). En azul, los recombinantes; en rojo, los controles susceptibles; en verde, los controles resistentes. Letras distintas para los genotipos en cada fecha de muestreo indican diferencias significativas (test LSD, $p < 0,05$).

Respecto a la acumulación viral, ninguno de los recombinantes presentó valores significativamente superiores a los de los controles resistentes ni a los 14 dpi ni a los 28 dpi, siendo muy inferiores a los detectados en los controles susceptibles, exceptuando el control 2A (Figura 11).

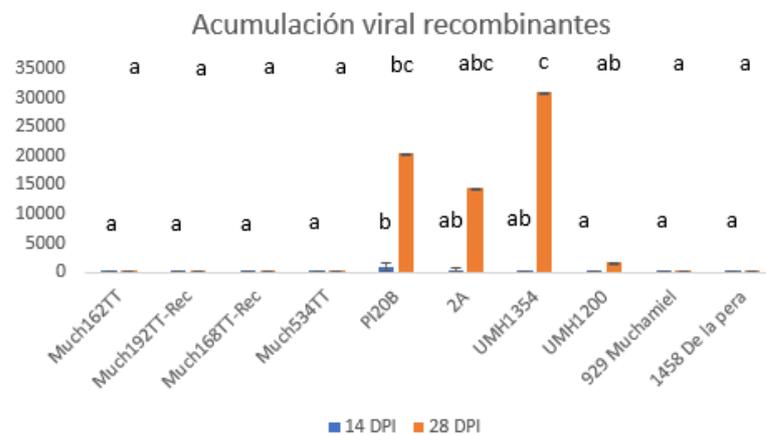


Figura 11. Promedio (\pm error estándar) de la acumulación relativa de ADN viral correspondiente a los 14 y 28 DPI en los recombinantes expresada como $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Letras distintas para los genotipos en cada fecha de muestreo indican diferencias significativas (test LSD, $p < 0,05$).

5. DISCUSIÓN

Las variedades comerciales de tomate incorporan generalmente múltiples resistencias a diferentes enfermedades desde hace décadas. En el caso de las variedades tradicionales los trabajos de introgresión de genes de resistencia son más recientes. En caso de la resistencia a TYLCV, el gen *Ty-1* ha sido el más utilizado para el desarrollo de variedades comerciales. Este gen, procede de la accesión LA1969 de *S. chilense*. El control genético es simple, al tratarse de un gen dominante y que proporciona un alto nivel de resistencia, por este motivo se ha generado su empleo (Pérez de Castro et al., 2013). Por tanto, la utilización de este gen puede resultar de gran interés para conservar las variedades tradicionales de tomate, permitiendo a los agricultores que todavía las cultivan poder obtener mejores rendimientos y disminuir las pérdidas económicas asociadas a la enfermedad del rizado amarillo del tomate.

Los materiales utilizados en este trabajo, como ya ha sido previamente mencionado, proceden del Departamento de Biología Aplicada de la UMH. Desde 1998, se ha ido desarrollado un programa de mejora basado en la introducción de tres genes de resistencia (*Tm-2^a*, *Sw-5* y *Ty-1*), que confieren resistencia a ToMV, TSWV y TYLCV, respectivamente. Las variedades tradicionales inicialmente empleadas fueron “Muchamiel” y “De la Pera”. El grupo investigador dispone de múltiples materiales de estas dos variedades con diferentes combinaciones de los genes de resistencia. Con el objetivo de conseguir más variedades tradicionales con estos genes de resistencia, en este trabajo se ha realizado una evaluación del gen *Ty-1* en diferentes líneas (ver apartado 3.1, Tabla 3).

Los materiales empleados en el trabajo derivan del programa de retrocruzamiento desarrollado a partir de estos materiales con fondo “Muchamiel” y “De la Pera”. En concreto, se han evaluado híbridos, retrocruces y recombinantes con “Flor de Baladre”, “Rosa de Altea” y “Morunos” utilizando el fondo genético de “Muchamiel” y “De la Pera”, resistentes al TYLCV. Todas estas variedades son muy conocidas en el sureste español por sus cualidades organolépticas, siendo todavía cultivados por agricultores de la zona. Existe un gran interés en conservar estas variedades, puesto que suponen una gran fuente de diversidad genética. (Rubio et al., 2012).

Los resultados obtenidos en la evaluación de los híbridos ponían de manifiesto que en aquellos que portaban el gen de resistencia no se observaban síntomas y la acumulación viral era muy baja en los distintos fondos genéticos ensayados. Se incluyeron en el ensayo híbridos con los mismos fondos, pero no portadores del gen *Ty-1*, y en ellos, sí que se observaban los síntomas característicos de la enfermedad, si bien no alcanzaban nunca una gravedad tan elevada como ocurría con los controles susceptibles. El gen *Ty-1* fue descrito inicialmente como incompletamente dominante, ya que la resistencia en heterocigotos era ligeramente inferior que

en homocigotos (Zamir et al., 1994). En estudios posteriores se han obtenido resultados variables. En algunos fondos se obtuvieron niveles de resistencia similares en homocigotos y heterocigotos para el *Ty-1* (Gómez & Laterrot, 1997; Pérez de Castro et al., 2013), mientras que en otros los heterocigotos presentaban síntomas más graves que los homocigotos (Pérez de Castro et al., 2008). Otros autores han obtenido resultados similares empleando otras fuentes de resistencia a TYLCV. En otros trabajos llevados a cabo por el grupo de investigación con resistencia derivada de las accesiones LA1932, LA1960 y LA1971 de *S. chilense*, no se encontraron diferencias significativas en la acumulación viral entre los híbridos y los parentales resistentes (Pérez de Castro et al., 2013), de forma similar a lo obtenido en este ensayo. Anbinder et al. (2009), trabajaron con la entrada TY172, cuya resistencia proviene de cuatro accesiones diferentes de *S. peruvianum*. Esta entrada se cruzó con dos entradas susceptibles de *S. pimpinellifolium*, LA1589 y LA375. Los híbridos con ambas entradas confirmaron que la resistencia tenía un control genético de dominancia incompleta, si bien el híbrido con LA1589 presentaba unos síntomas promedio entre los mostrados por los parentales, mientras que el otro híbrido era más similar a las entradas susceptibles. Por otra parte, los materiales comerciales desarrollados con resistencia basada en el *Ty-1*, son híbridos portadores del gen en heterocigosis; estos materiales muestran comportamiento resistente en las condiciones de cultivo en invernadero en el sureste español (comunicación personal de mejoradores de casas de semillas). Todos estos resultados ponen de manifiesto la importancia del fondo genético en la expresión de la resistencia. La resistencia conferida por el *Ty-1* se expresa en los distintos fondos genéticos empleados en este trabajo, dando lugar a materiales que permanecen prácticamente asintomáticos tras la infección con TYLCV y cuya acumulación viral es baja.

Los resultados obtenidos en el caso de los retrocruces ensayados fueron similares: no se observaron síntomas en ninguno de los retrocruces portadores del *Ty-1* en heterocigosis. Al estudiar la acumulación viral, no hubo ninguna diferencia significativa con respecto a los controles resistentes. En otros estudios también se obtuvieron resultados muy satisfactorios al incorporar el gen *Ty-1* en diferentes retrocruces con otras variedades de tomate (Hutton & Scott, 2017). De forma similar, se ha confirmado la efectividad de los programas de introgresión de la resistencia en programas de retrocruzamiento con otras fuentes de resistencia, tales como la derivada de *S. habrochaites* y de *S. pimpinellifolium* (Segbefia et al., 2018). Los resultados obtenidos en la evaluación de los retrocruces en el presente trabajo confirman la posibilidad de desarrollar materiales con resistencia basada en el *Ty-1* en diferentes fondos genéticos, manteniéndose la resistencia en retrocruces avanzados.

Por último, en el estudio de los materiales recombinantes de tomate, con una introgresión reducida (alrededor de 3 Mb) en la región del *Ty-1*, se confirmó que no mostraban síntomas en ningún momento de la evaluación, y además tenían carga viral muy baja, no siendo diferente

significativamente de la obtenida en los controles resistentes. Los materiales inicialmente desarrollados en el programa de mejora de la UMH con resistencia a TYLCV eran portadores de una introgresión de alrededor de 35 Mb en la región del *Ty-1* (Domingo, 2018). En los trabajos previos del grupo de la UMH se observaron efectos negativos sobre la productividad y la calidad del fruto, asociados al “arrastre por ligamiento” de la introgresión del *Ty-1* en distintos fondos tradicionales (García-Martínez et al., 2011; Rubio et al., 2012). En este trabajo se ha confirmado que materiales con introgresiones de menor tamaño mantienen la resistencia, siendo previsible que se vean reducidos los efectos negativos sobre los distintos caracteres de rendimiento y calidad.

6. CONCLUSIONES

Los diferentes materiales evaluados, tanto los híbridos, como los retrocruces como los recombinantes portadores del alelo de resistencia *Ty-1* han mostrado en todos los casos estudiados un elevado nivel de resistencia, el cual se ha manifestado como una ausencia de síntomas o la presencia de síntomas muy poco significativos.

La acumulación viral observada en los materiales evaluados portadores del alelo de resistencia fue muy reducida en comparación con la acumulación observada en los controles susceptibles.

Los materiales evaluados y bajo las condiciones empleadas en este ensayo, han mostrado, en general, un gran nivel de resistencia frente a la enfermedad causada por el TYLCV, confirmando la posibilidad de introgresar de forma eficiente la resistencia en distintos fondos genéticos.

Estos materiales pueden ser de interés para su incorporación en diferentes programas de mejora enfocados en la recuperación de variedades tradicionales, como pueden ser las variedades “Muchamiel” y “De la Pera”. En concreto, los retrocruces utilizados han dado resultados muy satisfactorios a la hora de incorporar la resistencia a TYLCV, lo cual permitiría obtener esta resistencia no solo en estas dos variedades, sino también en otras variedades tradicionales de gran interés, como son “Flor de Baladre”, los de tipo pimiento, los de tipo redondo o “Rosa de Altea”, entre otras.

Así mismo, la confirmación en los recombinantes evaluados de que introgresiones de menor tamaño son suficientes para incorporar la resistencia en los distintos fondos, podría proporcionar en el futuro nuevos materiales con características deseables y con resistencia a esta enfermedad.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Anbinder, I., Reuveni, M., Azari, R., Paran, I., Nahon, S., Shlomo, H., Chen, L., Lapidot, M., & Levin, I. (2009). Molecular dissection of Tomato leaf curl virus resistance in tomato line TY172 derived from *Solanum peruvianum*. *Theoretical and Applied Genetics*, *119*(3), 519–530. <https://doi.org/10.1007/s00122-009-1060-z>
- Barbieri, M., Acciarri, N., Sabatini, E., Sardo, L., Accotto, G. P., & Pecchioni, N. (2010). Introgression of resistance to two Mediterranean virus species causing Tomato yellow leaf curl into a valuable traditional tomato variety. *Journal of Plant Pathology*, *92*, 485–493.
- Bergougnoux, V. (2014). The history of tomato: From domestication to biopharming. *Biotechnology Advances*, *32*(1), 170–189. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.003>
- Buteme, R., Nakajiri, M., Kucel, N., Kabod, P. N., Sseremba, G., & Kizito, E. B. (2021). Intraspecific crossability and compatibility within *Solanum aethiopicum*. *Heliyon*, *7*(7), e07645. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07645>
- Butterbach, P., Verlaan, M. G., Dulleman, A., Lohuis, D., Visser, R. G. F., Bai, Y., & Kormelink, R. (2014). Tomato yellow leaf curl virus resistance by *Ty-1* involves increased cytosine methylation of viral genomes and is compromised by cucumber mosaic virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(35), 12942–12947. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400894111>
- Carbonell, P. (2021). *Programa de mejora genética de tomate tradicional UMH: nuevas técnicas moleculares, registro de líneas y agricultura de resiliencia*. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Carbonell, P., Alonso, A., Grau, A., Salinas, J., García-Martínez, S., & Ruiz, J. (2018). Twenty Years of Tomato Breeding at EPSO-UMH: Transfer Resistance from Wild Types to Local Landraces—From the First Molecular Markers to Genotyping by Sequencing (GBS). *Diversity*, *10*(1), 12. <https://doi.org/10.3390/d10010012>
- Cebolla-Cornejo, J., Soler, S., & Nuez, F. (2007). Genetic erosion of traditional varieties of vegetable crops in Europe: tomato cultivation in Valencia (Spain) as a case study. *International Journal of Plant Production*, *1*(2), 113–128.
- Cohen, S., & Antignus, Y. (1994). *Tomato Yellow Leaf Curl Virus, a Whitefly-Borne Geminivirus of Tomatoes* (pp. 259–288). https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2590-4_10
- da Silva, J. P. H., & Zerbini, F. M. (2024). *Taxonomic Classification of Geminiviruses Based on Pairwise Sequence Comparisons* (pp. 21–31). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3485-1_2
- Díaz-Pendón, J. A., Cañizares, M. C., Moriones, E., Bejarano, E. R., Czosnek, H., & Navas-Castillo, J. (2010). Tomato yellow leaf curl viruses: *ménage à trois* between the virus complex, the plant and the whitefly vector. *Molecular Plant Pathology*, *11*(4), 441–450. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00618.x>
- Díez, M. J., & Nuez, F. (2008). Tomato. In *Vegetables II* (pp. 249–323). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-74110-9_7

- Dipple, F. L., Ponce, F. da S., Toledo, C. A. de L., Da Silva, R. M., Grzebieluckas, C., & Seabra Júnior, S. (2024). Profitability and efficiency of conduction systems and optimal tomato density for fresh consumption. *Comunicata Scientiae*, 15, e4009. <https://doi.org/10.14295/cs.v15.4009>
- Domingo, M. (2018). *Evaluación de líneas de mejora de tomate (solanum lycopersicum l.) con resistencia genética a virus y menor carga de ligamiento durante el año 2018*. Trabajo Fin de Máster, Máster en Ingeniería Agronómica. Universidad Miguel Hernández.
- Elmer, J. S., Sunter, G., Gardiner, W. E., Brand, L., Browning, C. K., Bisaro, D. M., & Rogers, S. G. (1988). Agrobacterium-mediated inoculation of plants with tomato golden mosaic virus DNAs. *Plant Molecular Biology*, 10(3), 225–234. <https://doi.org/10.1007/BF00027399>
- Fauquet, C. M., & Stanley, J. (2005). Revising the way we conceive and name viruses below the species level: A review of geminivirus taxonomy calls for new standardized isolate descriptors. *Archives of Virology*, 150(10), 2151–2179. <https://doi.org/10.1007/s00705-005-0583-0>
- Fauquet, C. M., Sawyer, S., Idris, A. M., & Brown, J. K. (2005). Sequence Analysis and Classification of Apparent Recombinant Begomoviruses Infecting Tomato in the Nile and Mediterranean Basins. *Phytopathology*®, 95(5), 549–555. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-0549>
- Fiallo-Olivé, E., & Navas-Castillo, J. (2023). *The Role of Extensive Recombination in the Evolution of Geminiviruses* (pp. 139–166). https://doi.org/10.1007/978-3-031-15640-3_4
- Fiallo-Olivé, E., Lett, J.-M., Martin, D. P., Roumagnac, P., Varsani, A., Zerbini, F. M., & Navas-Castillo, J. (2021). ICTV Virus Taxonomy Profile: Geminiviridae 2021. *Journal of General Virology*, 102(12). <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001696>
- 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. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123(6), 1004–1007. <https://doi.org/10.21273/JASHS.123.6.1004>
- García-Andrés, S., Monci, F., Navas-Castillo, J., & Moriones, E. (2006). Begomovirus genetic diversity in the native plant reservoir *Solanum nigrum*: Evidence for the presence of a new virus species of recombinant nature. *Virology*, 350(2), 433–442. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2006.02.028>
- García-Martínez, S., Grau, A., Alonso, A., Rubio, F., Valero, M., & Ruiz, J. J. (2011). UMH 1200, a Breeding Line within the Muchamiel Tomato Type Resistant to Three Viruses. *HortScience*, 46(7), 1054–1055. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.46.7.1054>
- García-Martínez, S., Grau, A., Alonso, A., Rubio, F., Valero, M., & Ruiz, J. J. (2014). UMH 1422 and UMH 1415: Two Fresh-market Tomato Breeding Lines Resistant to Tomato Mosaic Virus and Tomato Spotted Wilt Virus. *HortScience*, 49(11), 1465–1466. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.49.11.1465>
- García-Martínez, S., Grau, A., Alonso, A., Rubio, F., Carbonell, P., & Ruiz, J. J. (2016). New Breeding Lines Resistant to Tomato Mosaic Virus and Tomato Spotted Wilt Virus within the ‘De la Pera’

- Tomato Type: UMH 1353 and UMH 1354. *HortScience*, 51(4), 456–458. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.51.4.456>
- Generalitat Valenciana. (2016). *Catálogo Valenciano de Variedades Tradicionales de Interés Agrario*. <https://Mediambient.Gva.Es/Es/Web/Cief/Cataleg-Valencia-de-Varietats-Tradicionals>.
- Ghani, M. A., Abbas, M. M., Amjad, M., Ziaf, K., Ali, B., Shaheen, T., Awan, F. S., & Khan, A. N. (2020). Production and characterisation of tomato derived from interspecific hybridisation between cultivated tomato and its wild relatives. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 95(4), 506–520. <https://doi.org/10.1080/14620316.2019.1689182>
- Ghanim, M., Morin, S., & Czosnek, H. (2001). Rate of *Tomato yellow leaf curl virus* Translocation in the Circulative Transmission Pathway of its Vector, the Whitefly *Bemisia tabaci*. *Phytopathology*®, 91(2), 188–196. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.2.188>
- Gill, U., Scott, J. W., Shekasteband, R., Ogundiwin, E., Schuit, C., Francis, D. M., Sim, S.-C., Smith, H., & Hutton, S. F. (2019). Ty-6, a major begomovirus resistance gene on chromosome 10, is effective against Tomato yellow leaf curl virus and Tomato mottle virus. *Theoretical and Applied Genetics*, 132(5), 1543–1554. <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03298-0>
- Gómez, O., & Laterrot, H. (1997). Herencia de la resistencia al virus del encrespamiento amarillo de las hojas del tomate (TYLCV). *Agrotecnia de Cuba*, 27, 38–42.
- El-Sappah, A., Qi, S., A. Soaud, S., Huang, Q., M. Saleh, A., A. S. Abourehab, M., Wan, L., Cheng, G., Liu, J., Ihtisham, M., Noor, Z., Rouf Mir, R., Zhao, X., Yan, K., Abbas, M., & Li, J. (2022). Natural resistance of tomato plants to Tomato yellow leaf curl virus. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1081549>
- 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. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125(1), 15–20. <https://doi.org/10.21273/JASHS.125.1.15>
- Hanssen, I. M., Lapidot, M., & Thomma, B. P. H. J. (2010). Emerging Viral Diseases of Tomato Crops. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 23(5), 539–548. <https://doi.org/10.1094/MPMI-23-5-0539>
- Hutton, S. F., & Scott, J. W. (2017). Fla. 7907C: A Fla. 7907 Near-isogenic Tomato Inbred Line Containing the Begomovirus Resistance Gene, Ty-1. *HortScience*, 52(4), 658–660. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI11827-17>
- Hutton, S. F., Scott, J. W., & Schuster, D. J. (2012). Recessive Resistance to Tomato yellow leaf curl virus from the Tomato Cultivar Tyking Is Located in the Same Region as Ty-5 on Chromosome 4. *HortScience*, 47(3), 324–327. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.47.3.324>
- Ji, Y., Schuster, D. J., & Scott, J. W. (2007). Ty-3, a begomovirus resistance locus near the Tomato yellow leaf curl virus resistance locus Ty-1 on chromosome 6 of tomato. *Molecular Breeding*, 20(3), 271–284. <https://doi.org/10.1007/s11032-007-9089-7>

- 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 *Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease* (pp. 343–362). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4769-5_20
- 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. *HortScience*, *44*(3), 614–618. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.44.3.614>
- Jupin, I., De Kouchkovsky, F., Jouanneau, F., & Gronenborn, B. (1994). Movement of Tomato Yellow Leaf Curl Geminivirus (TYLCV): Involvement of the Protein Encoded by ORF C4. *Virology*, *204*(1), 82–90. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1512>
- Kanakala, S., & Ghanim, M. (2019). Global genetic diversity and geographical distribution of *Bemisia tabaci* and its bacterial endosymbionts. *PLOS ONE*, *14*(3), e0213946. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213946>
- Khan, M. S., Tiwari, A. K., Khan, A. A., Ji, S. H., & Chun, S. C. (2013). Current Scenario of *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* (TYLCV) and its Possible Management: A Review. *Vegetos- An International Journal of Plant Research*, *26*(2s), 139. <https://doi.org/10.5958/j.2229-4473.26.2s.132>
- Khazaei, H., & Madduri@gmail.com, A. (2022). role of tomato wild relatives in breeding disease-free varieties. *Genetic Resources*, *3*(6), 64–73. <https://doi.org/10.46265/genresj.PSES6766>
- Kheyr-Pour, A., Gronenborn, B., & Czosner, H. (1994). Agroinoculation of Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV) Overcomes the Virus Resistance of Wild *Lycopersicon* Species. *Plant Breeding*, *112*(3), 228–233. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1994.tb00675.x>
- Kliot, A., & Ghanim, M. (2013). The Role of Bacterial Chaperones in the Circulative Transmission of Plant Viruses by Insect Vectors. *Viruses*, *5*(6), 1516–1535. <https://doi.org/10.3390/v5061516>
- Koeda, S., Homma, K., Tanaka, Y., Kesumawati, E., Zakaria, S., & Kanzaki, S. (2017). Highly Efficient Agroinoculation Method for Tomato Plants with <i>Tomato Yellow Leaf Curl Kanchanaburi Virus</i>. *The Horticulture Journal*, *86*(4), 479–486. <https://doi.org/10.2503/hortj.OKD-049>
- Kumaraswamy, S., Sotelo-Cardona, P., Shivanna, A., Mohan, M., & Srinivasan, R. (2024). Evaluation of resistance in wild tomato accessions to the whitefly *Bemisia tabaci* and the invasive tomato leafminer *Tuta absoluta*. *Entomologia Generalis*, *44*(2), 307–314. <https://doi.org/10.1127/entomologia/2024/2368>
- Lapidot, M. (2007). Screening for TYLCV-Resistance Plants using Whitefly-Mediated Inoculation. In *Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease* (pp. 329–342). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4769-5_19
- Lapidot, M., Karniel, U., Gelbart, D., Fogel, D., Evenor, D., Kutsher, Y., Makhbash, Z., Nahon, S., Shlomo, H., Chen, L., Reuveni, M., & Levin, I. (2015). A Novel Route Controlling Begomovirus Resistance by the Messenger RNA Surveillance Factor Pelota. *PLOS Genetics*, *11*(10), e1005538. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005538>

- Lassoued, R., Smyth, S. J., Phillips, P. W. B., & Hessel, H. (2018). Regulatory Uncertainty Around New Breeding Techniques. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01291>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Luo, C., Jones, C. M., Devine, G., Zhang, F., Denholm, I., & Gorman, K. (2010). Insecticide resistance in *Bemisia tabaci* biotype Q (Hemiptera: Aleyrodidae) from China. *Crop Protection*, 29(5), 429–434. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2009.10.001>
- Mallet, J. (2008). Hybridization, ecological races and the nature of species: empirical evidence for the ease of speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1506), 2971–2986. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0081>
- Monci, F., Sánchez-Campos, S., Navas-Castillo, J., & Moriones, E. (2002). A Natural Recombinant between the Geminiviruses Tomato yellow leaf curl Sardinia virus and Tomato yellow leaf curl virus Exhibits a Novel Pathogenic Phenotype and Is Becoming Prevalent in Spanish Populations. *Virology*, 303(2), 317–326. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1633>
- Morales, F. J. (2001). Conventional breeding for resistance to *Bemisia tabaci*-transmitted geminiviruses. *Crop Protection*, 20(9), 825–834. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(01\)00114-4](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(01)00114-4)
- Naciones Unidas. (2022). *Informe de los Objetivos de Desarrollo Sostenible 2022*. <https://unstats.un.org/sdgs/report/2022/the-sustainable-development-goals-report-2022-spanish.pdf>
- Oliveira, M. R. V., Henneberry, T. J., & Anderson, P. (2001). History, current status, and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*. *Crop Protection*, 20(9), 709–723. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(01\)00108-9](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(01)00108-9)
- Ong, S. N., Taheri, S., Othman, R. Y., & Teo, C. H. (2020). Viral disease of tomato crops (*Solanum lycopersicum* L.): an overview. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 127(6), 725–739. <https://doi.org/10.1007/s41348-020-00330-0>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (n.d.). Conjunto de datos de producción agrícola. FAO. Acceso mayo de 2024 <https://www.fao.org/faostat/en/#data>
- Panno, S., Davino, S., Caruso, A. G., Bertacca, S., Crnogorac, A., Mandić, A., Noris, E., & Matic, S. (2021). A Review of the Most Common and Economically Important Diseases That Undermine the Cultivation of Tomato Crop in the Mediterranean Basin. *Agronomy*, 11(11), 2188. <https://doi.org/10.3390/agronomy11112188>
- Pathak, V. M., Verma, V. K., Rawat, B. S., Kaur, B., Babu, N., Sharma, A., Dewali, S., Yadav, M., Kumari, R., Singh, S., Mohapatra, A., Pandey, V., Rana, N., & Cunill, J. M. (2022). Current status of pesticide effects on environment, human health and its eco-friendly management as bioremediation: A comprehensive review. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.962619>

- Pavan, S., van Heusden, A. W., & Bai, Y. (2009). *Solanum lycopersicum* (Tomato). In *Encyclopedia of Life Sciences*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0003686>
- Pease, J. B., Haak, D. C., Hahn, M. W., & Moyle, L. C. (2016). Phylogenomics Reveals Three Sources of Adaptive Variation during a Rapid Radiation. *PLOS Biology*, *14*(2), e1002379. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002379>
- Peralta, I. E., Knapp, S., & Spooner, D. M. (2005). New Species of Wild Tomatoes (<I>Solanum</I> Section <I>Lycopersicon</I>; Solanaceae) from Northern Peru. *Systematic Botany*, *30*(2), 424–434. <https://doi.org/10.1600/0363644054223657>
- Peralta, I. E., Spooner, D. M., & Knapp, S. (2008). *Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (Solanum sect. Lycopersicoides, sect. Juglandifolia, sect. Lycopersicon; Solanaceae)* (84th ed.). Systematic botany monographs.
- Pérefarres, F., Thierry, M., Becker, N., Lefeuvre, P., Reynaud, B., Delatte, H., & Lett, J.-M. (2012). Biological Invasions of Geminiviruses: Case Study of TYLCV and Bemisia tabaci in Reunion Island. *Viruses*, *4*(12), 3665–3688. <https://doi.org/10.3390/v4123665>
- Pérez de Castro, A., Blanca, J. M., Díez, M. J., & Nuez Viñals, F. (2007). Identification of a CAPS marker tightly linked to the Tomato yellow leaf curl disease resistance gene Ty-1 in tomato. *European Journal of Plant Pathology*, *117*(4), 347–356. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9103-2>
- Pérez de Castro, A., Díez, M. J., & Nuez, F. (2008). Exploiting Partial Resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* Derived from *Solanum pimpinellifolium* UPV16991. *Plant Disease*, *92*(7), 1083–1090. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-7-1083>
- Pérez de Castro, A. M., Díez, M. J., & Nuez, F. (2010). Actas de Horticultura . *Resistencia a La Enfermedad Del Rizado Amarillo Del Tomate En La Especie Silvestre Solanum Lycopersicoides*, 169–170.
- Pérez de Castro, A., Julián, O., & Díez, M. J. (2013). Genetic control and mapping of *Solanum chilense* LA1932, LA1960 and LA1971-derived resistance to Tomato yellow leaf curl disease. *Euphytica*, *190*(2), 203–214. <https://doi.org/10.1007/s10681-012-0792-z>
- Pérez-Caselles, C., Brugarolas, M., & Martínez-Carrasco, L. (2020). Traditional Varieties for Local Markets: A Sustainable Proposal for Agricultural SMEs. *Sustainability*, *12*(11), 4517. <https://doi.org/10.3390/su12114517>
- 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*(1), 121–129. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-19-0232-FI>
- Picó, B., Ferriol, M., Díez, M. J., & Viñals, F. N. (2001). Agroinoculation methods to screen wild *Lycopersicon* for resistance to Tomato yellow leaf curl virus. . *Journal of Plant Pathology*, *83*, 215–220.

- Quazi M. I. Haq, Fatma H. Alrasbi, Alzahra A. A. Alnaabi, & Marwa S. M. Alsaadi. (2023). Biological Invasions of Begomoviruses: A Case Study of TYLCV and Bemisia tabaci in Oman. *Applied Science and Biotechnology Journal for Advanced Research*, 2(6), 1–10. <https://doi.org/10.31033/abjar.2.6.1>
- Ramírez-Ojeda, G., Peralta, I. E., Rodríguez-Guzmán, E., Sahagún-Castellanos, J., Chávez-Servia, J. L., Medina-Hinostroza, T. C., Rijalba-Vela, J. R., Vásquez-Núñez, L. P., & Rodríguez-Pérez, J. E. (2021). Edaphoclimatic Descriptors of Wild Tomato Species (*Solanum* Sect. *Lycopersicon*) and Closely Related Species (*Solanum* Sect. *Juglandifolia* and Sect. *Lycopersicoides*) in South America. *Frontiers in Genetics*, 12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.748979>
- Ramos, R. S., Kumar, L., Shabani, F., & Picanço, M. C. (2019). Risk of spread of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in tomato crops under various climate change scenarios. *Agricultural Systems*, 173, 524–535. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2019.03.020>
- Ren, Y., Tao, X., Li, D., Yang, X., & Zhou, X. (2022). ty-5 Confers Broad-Spectrum Resistance to Geminiviruses. *Viruses*, 14(8), 1804. <https://doi.org/10.3390/v14081804>
- 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 Review of Phytopathology*, 43(1), 361–394. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135939>
- Rubio, F., García-Martínez, S., Alonso, A., Grau, A., Valero, M., & Ruiz, J. J. (2012). Introgressing resistance genes into traditional tomato cultivars: effects on yield and quality. *Acta Horticulturae*, 935, 29–33. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.935.3>
- 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>
- Segbefia, M. M., Amoatey, H. M., Ahiakpa, J. K., Quartey, E. K., Appiah, A. S., Nunoo, J., & Kusi-Adjei, R. (2018). Field evaluation of tomato varieties/breeding lines against tomato yellow leaf curl virus disease (TYLCV). *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 41(1).
- Shen, X., Yan, Z., Wang, X., Wang, Y., Arens, M., Du, Y., Visser, R. G. F., Kormelink, R., Bai, Y., & Wolters, A.-M. A. (2020). The NLR Protein Encoded by the Resistance Gene Ty-2 Is Triggered by the Replication-Associated Protein Rep/C1 of Tomato Yellow Leaf Curl Virus. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.545306>
- Shirazi, M., Mozafari, J., Rakhshandehroo, F., & Shams-Bakhsh, M. (2014). Genetic diversity, host range, and distribution of tomato yellow leaf curl virus in Iran. *Acta Virologica*, 58(02), 128–136. https://doi.org/10.4149/av_2014_02_128
- Takken, F. L. W., & Joosten, M. H. A. J. (2000). Plant Resistance Genes: Their Structure, Function and Evolution. *European Journal of Plant Pathology*, 106(8), 699–713. <https://doi.org/10.1023/A:1026571130477>
- Verlaan, M. G., Szinay, D., Hutton, S. F., de Jong, H., Kormelink, R., Visser, R. G. F., Scott, J. W., & Bai, Y. (2011). Chromosomal rearrangements between tomato and *Solanum chilense* hamper mapping

- and breeding of the TYLCV resistance gene *Ty-1*. *The Plant Journal*, 68(6), 1093–1103. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04762.x>
- Verlaan, M. G., Hutton, S. F., Ibrahim, R. M., Kormelink, R., Visser, R. G. F., Scott, J. W., Edwards, J. D., & Bai, Y. (2013). The Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistance Genes Ty-1 and Ty-3 Are Allelic and Code for DFDGD-Class RNA-Dependent RNA Polymerases. *PLoS Genetics*, 9(3), 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. *Scientific Reports*, 8(1), 9592. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27925-w>
- Wartig, L., Kheyr-Pour, A., Noris, E., De Kouchkovsky, F., Jouanneau, F., Gronenborn, B., & Jupin, I. (1997). Genetic Analysis of the Monopartite Tomato Yellow Leaf Curl Geminivirus: Roles of V1, V2, and C2 ORFs in Viral Pathogenesis. *Virology*, 228(2), 132–140. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.8406>
- Weller, S. A., Elphinstone, J. G., Smith, N. C., Boonham, N., & Stead, D. E. (2000). Detection of *Ralstonia solanacearum* Strains with a Quantitative, Multiplex, Real-Time, Fluorogenic PCR (TaqMan) Assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7), 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. *Frontiers in Plant Science*, 9. <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(4), 740. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040740>
- Zamir, D., Ekstein-Michelson, I., Zakay, Y., Navot, N., Zeidan, M., Sarfatti, M., Eshed, Y., Harel, E., Pleban, T., van-Oss, H., Kedar, N., Rabinowitch, H. D., & Czosnek, H. (1994). Mapping and introgression of a tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, TY-1. *Theoretical and Applied Genetics*, 88(2), 141–146. <https://doi.org/10.1007/BF00225889>
- Zhang, H., Gong, H., & Zhou, X. (2009). Molecular characterization and pathogenicity of tomato yellow leaf curl virus in China. *Virus Genes*, 39(2), 249–255. <https://doi.org/10.1007/s11262-009-0384-8>
- Zimny, T., Sowa, S., Tyczewska, A., & Twardowski, T. (2019). Certain new plant breeding techniques and their marketability in the context of EU GMO legislation – recent developments. *New Biotechnology*, 51, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.02.003>

8. ANEXOS

ANEXO I. RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030

Tabla S1: Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

Objetivos de Desarrollo Sostenibles	Alto	Medio	Bajo	No Procede
ODS 1. Fin de la pobreza.				X
ODS 2. Hambre cero.	X			
ODS 3. Salud y bienestar.	X			
ODS 4. Educación de calidad.				X
ODS 5. Igualdad de género.		X		
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.		X		
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.			X	
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.				X
ODS 10. Reducción de las desigualdades.		X		
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.		X		
ODS 12. Producción y consumo responsables.	X			
ODS 13. Acción por el clima.	X			
ODS 14. Vida submarina.		X		
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.	X			
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.				X

Los pesticidas se utilizan de manera general para prevenir enfermedades transmitidas por vectores. Su utilización mundial en 2019 fue de 4,19 millones de toneladas, siendo casi la mitad de ellos herbicidas, seguidos de insecticidas y fungicidas. Su uso extensivo tiene graves consecuencias en los ecosistemas, tanto en el suelo y en el agua, como para los animales y personas en contacto con ellos (Pathak et al., 2022). En este contexto, es fundamental encontrar genes de resistencia para tratar de mitigar los impactos ambientales asociados con el empleo de estos productos, minimizando la dependencia a su uso. Todo esto, consecuentemente, pretende

evitar la contaminación ambiental, tratando también de evitar daños a la vida terrestre de nuestro planeta.

Existen también grandes restricciones en la Unión Europea en lo referente al empleo de nuevas técnicas para el desarrollo de nuevas variedades con mayor resistencia, como podrían ser la mutagénesis dirigida por oligonucleótidos (ODMs) y técnicas basadas en CRISPR (Zimny et al., 2019). Es por ello que resulta fundamental seguir avanzando y haciendo uso de las técnicas tradicionales de mejora genética (Lassoued et al., 2018).

Este trabajo, por tanto, presenta un alto grado de relación con los Objetivos de Desarrollo Sostenible promovidos por todos los Estados pertenecientes a las Naciones Unidas (Naciones Unidas, 2022). Podemos destacar la relación con el ODS 2, de “Hambre cero”, el cual se centra en la lucha por acabar con el hambre, logrando consecuentemente la seguridad alimentaria y la mejora de la nutrición, promoviendo también una agricultura sostenible. Siguiendo esta línea, este trabajo aborda directamente la problemática de promover la agricultura sostenible, evitando hacer uso en la medida de lo posible de productos químicos perjudiciales. Esto se enmarca concretamente en la meta 2.4 “Sistemas de producción sostenibles” y la meta 2.5 “Diversidad genética de las semillas y los cultivos”, donde se busca aumentar la sostenibilidad de los sistemas de producción de alimentos y mantener la diversidad genética de las semillas y las plantas cultivadas, respectivamente.

En lo referente al resto de objetivos, encontramos también una alta relación con varios de ellos. En concreto, con el ODS 3 de “Salud y Bienestar”, si tenemos en cuenta que la meta 3.9 trata de reducir el número de muertes por productos químicos y contaminantes, este trabajo cumple en gran medida con esta propuesta, puesto que el desarrollo de líneas de tomate resistentes a TYLCV reduce significativamente la necesidad de utilizar pesticidas para controlar el insecto vector de la enfermedad, mejorando consecuentemente la salud pública al disminuir la contaminación y la exposición de estas sustancias tóxicas en la población general y en los trabajadores agrarios. En cuanto al ODS 12, de “Producción y consumo responsables”, puede enmarcarse en las metas 12.2 y 12.4, que tratan de lograr la gestión sostenible y el uso eficiente de los recursos naturales, así como de lograr la gestión ambientalmente racional de los productos químicos y todos los desechos a lo largo de su ciclo de vida, respectivamente. La resistencia a TYLCV en tomates puede aumentar la eficiencia de la producción agrícola, y también se reduce la cantidad de desperdicios agrícolas, ya que habrá menos plantas afectadas por la enfermedad.

El ODS 13, de “Acción por el clima”, también adquiere mucha importancia en este trabajo, en concreto la meta 13.1, que pretende fortalecer la resiliencia y la capacidad de adaptación a los riesgos relacionados con el clima y los desastres naturales. El cambio climático está generando

un incremento de las poblaciones de mosca blanca, insecto vector de TYLCV, entre otros virus. El desarrollo de materiales resistentes incrementará la capacidad de adaptación a este cambio.

Por último, otro objetivo relevante es el ODS 15, de “Vida en ecosistemas terrestres”, donde destacan las metas 15.1 y 15.5. La primera de ellas pretende asegurar la conservación y el uso sostenible de ecosistemas terrestres y de agua dulce, y la segunda trata de adoptar medidas urgentes para reducir la degradación de los hábitats naturales y detener la pérdida de biodiversidad. Al reducir el uso de los pesticidas y promover prácticas más sostenibles, como es el caso de genes de resistencia, se contribuye enormemente a conservar la biodiversidad en los ecosistemas.

Este Trabajo Fin de Máster también puede relacionarse, consecuentemente y tras lo expuesto, con los ODS 6, 11 y 14, de “Agua limpia y saneamiento”, “Ciudades y comunidades sostenibles” y “Vida submarina”, respectivamente.

Otro aspecto relevante es la relación del trabajo con el ODS 5, de “Igualdad de género” y el ODS 10, de “Reducción de las desigualdades”. Si nos centramos en el primero de ellos, la formación y el acceso a la tecnología y la reducción de la carga de trabajo, puede mejorar la calidad de vida de muchas mujeres que son responsables de la agricultura de subsistencia en muchas partes del mundo. Así mismo, la implementación de genes de resistencia puede formar parte de programas de formación dirigidos a mujeres agricultoras, mejorando sus ingresos y calidad de vida. Esta formación también las dota de oportunidades que favorezcan su liderazgo. En cuanto al ODS 10, la distribución de semillas resistentes podría asegurar que las comunidades más vulnerables puedan beneficiarse del desarrollo agrícola, aumentando su productividad y seguridad alimentaria y disminuyendo la brecha económica.

Por tanto, este Trabajo Fin de Máster, basado en el empleo del gen de resistencia *Ty-1* en variedades tradicionales de tomate, puede contribuir y relacionarse con varios ODS al promover, especialmente, prácticas agrícolas más sostenibles y eficientes, reducir la dependencia a los pesticidas, mejorar la conservación de la biodiversidad, y asegurar el desarrollo agrícola y la seguridad alimentaria. Así mismo, con las políticas adecuadas, este trabajo también podría relacionarse con la reducción de las desigualdades, especialmente para las mujeres de países más subdesarrollados, así como con el acceso equitativo a tecnologías más avanzadas que garantizan un desarrollo más justo, equitativo y sostenible.