



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Instituto de Conservación y Mejora
de la Agrobiodiversidad Valenciana

“Aprovechamiento de la especie *Solanum peruvianum* en la mejora del tomate”

Gabriela Natalia Campos

Directoras:

Dra. Ana María Pérez de Castro

Dra. María José Díez Niclós

Valencia, febrero 2018

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis directoras, Ana Pérez de Castro y María José Díez Niclós, por haberme dado la posibilidad de trabajar en su grupo de investigación, por sus enseñanzas y por su apoyo en los momentos complicados. Ana y María José, muchas gracias por su gran dedicación en este trabajo y por su excelente criterio, sin ustedes yo no hubiese podido llegar hasta aquí. De corazón, muchas gracias por haberme ayudado tantísimo en todo.

Al COMAV y a todo el personal que apoyó este trabajo.

A la Lic. Patricia Muñoz Espert por su ayuda en el laboratorio e invernaderos, pero sobre todo por ser mi amiga. Gracias, querida Patric, por tu amistad, los consejos, los cafés, la compañía y por seguir estando siempre para mí, a pesar de la distancia.

A la Lic. Elena Zafón Chuliá por toda la contribución a esta tesis, pero también por la compañía, los almuerzos, los consejos y los momentos lindos del día a día.

A las personas que te hacen el día más bonito: Merche, Raúl, Ana, Jaime, Miguel, Eva, José Vicente, Rosa y Ángel. Gracias por las charlas, la ayuda y el buen rollo siempre.

A la Dra. Belén Picó por el asesoramiento y ayuda en todo lo referido al Programa de Doctorado en Biotecnología.

Desde el punto de vista formal me gustaría agradecer la financiación recibida. Este trabajo ha sido financiado mediante el proyecto AGL2011-30083 del Ministerio de Ciencia e Innovación.

También quisiera agradecer la concesión de una beca predoctoral dentro del programa ARCOIRIS Erasmus Mundus y a todas las personas que han formado parte del programa:

A Silvia Carosso y al Politecnico di Torino por la coordinación de mi beca en Valencia y por su asistencia en todo momento.

Quiero agradecer de manera muy especial a Begoña Lluzar Julián por todo lo relacionado a mi estancia en Valencia, por sus consejos, sus “gritos” y su gran compromiso con sus becarios, entre muchas cosas más. Siempre te recordaré y te llevaré en mi corazón.

Muchas gracias a Geraldine Bustamente Reyes, a Esther Durá Olcina y a toda la Oficina de Acción Internacional (OAI) de la UPV por resolver mis dudas, por su ayuda en todo tipo de trámites y por el buen rollo que tienen con los becarios.

Quisiera agradecer a la Dra. Raquel Chan por haberme permitido realizar una estancia en su laboratorio en el IAL-CONICET (Santa Fe-Argentina) y siempre estar pendiente de mis necesidades.

A las grandes personas que me dejó la estancia en el IAL:

Flor, muchas gracias por estar siempre pendiente de mis cosas, por compartir los libros y las historias, por tu gran ayuda en el laboratorio, por enseñarme todo con mucha paciencia y por ser tan buena amiga.

Cele, muchas gracias por tus enseñanzas, por tu risa contagiosa, por hacer que todo parezca fácil y por ser una gran compañera y amiga.

Pame, gracias por haberme guiado y enseñado durante mi estancia.

Virgi, gracias por tus palabras de motivación, la ayuda en el laboratorio y las risas.

Cati y Lucas, los peques, muchas gracias por todo, por su ayuda en el lab, las charlas y la buena onda.

De manera muy especial quiero agradecer a mi familia por su apoyo en todo momento:

A mi madre, que siempre está a mi lado con sus palabras aliento, sus consejos, sus ocurrencias, su amor y su apoyo incondicional.

A mi Loly, por acompañarme en todo momento, por los viajes, los matecitos, los consejos y todo el amor y la complicidad de siempre.

A mi abuela, que siempre encuentra los consejos justos, las palabras correctas y la manera de hacerte ver que sos muy valiente y que siempre se encuentra la salida con la ayuda de Dios.

A Diego, que siempre está pendiente y me alegra con sus ocurrencias.

A Juan, mi compañero, gracias por el aguante, los consejos, los “yo te dije”, la ayuda en todo momento, el amor, la compañía y los “mates sanadores”. Valencia no hubiera sido igual sin vos.

INDICE

RESUMEN	1
Versión en español.....	2
Versión en inglés	4
Versión en valenciano	6
INTRODUCCION	9
1. Taxonomía del tomate y especies silvestres relacionadas.....	10
2. Utilización de las especies silvestres en mejora.....	13
2.1. Utilización de <i>Solanum peruvianum</i> en la mejora del tomate.....	15
3. Poblaciones de premejora	16
3.1. Líneas recombinantes consanguíneas.....	17
3.2. Poblaciones de retrocruces avanzados	18
3.3. Generación de retrocruces avanzados con autofecundaciones	19
3.4. Líneas de introgresion	20
3.5. Poblaciones de premejora desarrolladas con especies silvestres relacionadas con el tomate.....	21
4. La enfermedad del rizado amarillo del tomate.....	24
4.1. Historia de la enfermedad.....	24
4.2. Organización del genoma del virus	25
4.3. Síntomas causados por el complejo de virus causante de TYLCD.....	25
4.4. Transmisión	26
4.5. Gama de hospedantes.....	27
4.6. TYLCD en España	28
4.7. Métodos para el control de la enfermedad	29
4.8. Mejora genética para la resistencia	30
4.9. Mapeo de genes de resistencia.....	32
Bibliografía	33
OBJETIVOS	51
Obtaining advanced generations from <i>Solanum peruvianum</i> PI 126944 in the genetic background of <i>S. lycopersicum</i> by immature seed culture.....	54
ABSTRACT.....	55
INTRODUCTION	56
MATERIALS AND METHODS	58
RESULTS.....	60
DISCUSSION.....	70
REFERENCES	74

Evaluation under diverse conditions of a differential host reaction scale to Tomato yellow leaf curl virus in tomato	78
SUMMARY	79
INTRODUCTION	80
MATERIALS AND METHODS	82
RESULTS.....	85
DISCUSSION	92
LITERATURE CITED.....	96
DISCUSIÓN GENERAL.....	101
Obtención de generaciones avanzadas a partir de <i>Solanum peruvianum</i> PI 126944 en el fondo genético de <i>Solanum lycopersicum</i> mediante el cultivo de semillas inmaduras	102
Evaluación en diversas condiciones de una escala de hospedantes diferenciales de tomate frente al virus del rizado amarillo del tomate, <i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	106
BIBLIOGRAFÍA	110
CONCLUSIONES	116

RESUMEN

Versión en español

La entrada PI 126944 de *S. peruvianum* ha sido descrita como resistente a distintos estreses bióticos, entre ellos a la enfermedad del rizado amarillo del tomate (Tomato yellow leaf curl disease, TYLCD) y al virus del bronceado del tomate (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV). En trabajos previos realizados en el Instituto Universitario para la Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV) se obtuvieron tres híbridos interespecíficos entre esta entrada y el tomate cultivado, empleando el rescate de semillas inmaduras. En trabajos posteriores, también empleando rescate de embriones o de semillas inmaduras, se desarrollaron generaciones más avanzadas a partir de estos materiales, incluyendo hasta las generaciones pseudo-F₆ y retrocruces hacia la especie cultivada de algunas de las generaciones pseudo-F_n. En el transcurso de la obtención de estas generaciones se probaron los materiales por su resistencia a ambos virus, demostrando la introgresión con éxito de la misma. Con objeto de localizar los genes responsables de la resistencia y aprovechar estos materiales en la mejora del tomate cultivado se inició, en trabajos anteriores del grupo, el desarrollo de un conjunto de líneas de introgresión (*Introgression lines*, ILs) que contengan el genoma de la entrada PI 126944 en el fondo genético de *S. lycopersicum*. Para tener correctamente representado el genoma de la especie donante en el fondo genético del tomate es necesario obtener un gran número de descendientes, por lo que es necesario optimizar los protocolos hasta entonces empleados con el objeto de conseguir materiales avanzados derivados de esta entrada.

En este sentido, el primer objetivo de esta tesis fue el estudio de distintos factores implicados en la superación de las barreras de incompatibilidad, con objeto de conseguir un elevado número de descendientes y maximizar la probabilidad de introgresar el genoma de PI 126944 en el conjunto de ILs. Se llevaron a cabo tres ensayos de retrocruce, iniciados con diferentes plantas de las generaciones pseudo-F₄, pseudo-F₅ y pseudo-F₆. El genotipo de los parentales resultó ser un factor determinante en la obtención de descendencia, por lo que se recomienda utilizar el máximo número de genotipos distintos, con objeto de maximizar la probabilidad de obtener progenie. Se llevó a cabo una prueba de medios de cultivo que permitió seleccionar la combinación más adecuada de auxinas y citoquininas para el cultivo de semillas inmaduras y posterior regeneración de plantas. Se estudió el efecto del número de días transcurridos desde la polinización hasta la recolección de los frutos, habiéndose obtenido resultados distintos en los tres ensayos.

Dado que resulta difícil atribuir únicamente a este factor las diferencias encontradas, sería necesario realizar un ensayo más preciso controlando otros factores, tales como el tamaño de las flores en el momento de la polinización. Se comprobó que tanto la selección de las semillas inmaduras con mayor desarrollo como la realización de un corte en la cubierta de las semillas, con objeto de facilitar el desarrollo del embrión, permitieron incrementar la eficiencia en la obtención de plantas regeneradas. La vía mayoritaria de regeneración en el primer ensayo fue la formación de callos, si bien en el segundo y el tercero fue más frecuente la regeneración directa. Posiblemente, la mayor proximidad genética con el tomate cultivado de las generaciones empleadas en los ensayos 2 y 3 expliquen estos resultados.

Se obtuvieron un total de 77, 365 y 339 plantas, en cada uno de los ensayos, respectivamente. Muchos de estos materiales han sido aclimatados y fenotipados, habiéndose comprobado que en muchos casos ha sido posible obtener semilla de autofecundación que ha germinado normalmente. Estos resultados indican que es posible continuar con la construcción de la colección de ILs prescindiendo del cultivo de semillas para estas generaciones más avanzadas. El genotipado de los materiales disponibles permitirá determinar la necesidad de recurrir a generaciones anteriores para cubrir las regiones del genoma no representadas en las generaciones obtenidas.

Tal y como se ha comentado anteriormente, esta colección de ILs presenta interés por la resistencia del parental donante a TYLCD, entre otros caracteres. Una vez se complete la colección, se evaluará por su resistencia a esta enfermedad. Los estudios previos han mostrado que se trata probablemente de una resistencia poligénica, cuya expresión a menudo es más dependiente de las condiciones ambientales y de otros factores. En estos casos, el empleo de un solo testigo resistente y otro susceptible no es suficiente para determinar con exactitud el nivel de resistencia de los materiales en estudio. La disponibilidad de controles con distintos niveles de resistencia permitiría realizar un fenotipado más preciso. Un grupo de investigadores del “Volcani Center” desarrollaron una escala compuesta por siete líneas con diversos niveles de resistencia a TYLCD, introgresada a partir de distintas especies silvestres. En el marco de esta tesis se evaluó el comportamiento de esta escala en siete ensayos distintos, cuatro de ellos llevados a cabo en el COMAV-UPV y los otros tres en el Instituto Nacional de Ciencias Hortícolas de Cuba. Se compararon dos aislados de TYLCV (*Tomato yellow leaf curl virus*), una de las especies causantes de TYLCD, diferentes métodos de inoculación, dos

estados de desarrollo de la planta y distintas condiciones ambientales. En general, los síntomas fueron más leves que los obtenidos en las condiciones ensayadas por los autores que desarrollaron la escala, si bien el orden de las líneas en la escala se mantuvo, con pocas excepciones. Sin embargo, en la mayor parte de las condiciones, la respuesta obtenida no correspondió a una escala gradual, ya que se observó una gran diferencia entre los valores de síntomas de las líneas susceptibles y las resistentes, siendo muy pequeñas las diferencias entre las líneas resistentes. Estos resultados sugieren la posibilidad de reducir el número de líneas a emplear en cada condición concreta, seleccionando la más susceptible, la más resistente y alguna con niveles intermedios de resistencia.

Versión en inglés

Accession *S. peruvianum* PI 126944 has been reported as resistant to several biotic stresses, among them to Tomato yellow leaf curl disease, (TYLCD) and to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). In previous works carried out in the “Instituto Universitario para la Conservación y Mejora de la Agrobiodiversidad Valenciana” (COMAV) three interspecific hybrids between this accession and cultivated tomato were obtained, using immature seeds rescue. In subsequent works, also using embryo or immature seeds rescue, more advanced generations from these materials were developed, including until the pseudo-F₆ generations and backcrosses to the cultivated species of some of the pseudo-F_n generations. In the course of the obtaining of these generations, some of these materials were tested for resistance to both viruses, showing the successful introgression of these traits. With the aim of identifying the genes responsible of the resistance and taking advantage of these materials in the improvement of cultivated tomato, in previous works of the group, the development of a set of Introgression lines (ILs) that contain the genome of the accession PI 126944 in the genetic background of *S. lycopersicum* was initiated. The obtaining of a large number of descendants is necessary in order to have correctly represented the genome of the donor species, thus there is the need to optimize the protocols previously used to get advanced materials derived from this accession.

In this sense, the first aim of this work was the study of several factors involved in the overcoming of the incompatibility barriers, to obtain a high number of descendants and maximize the probability of introgressing the genome of PI 126944 in the set of ILs.

Three backcross assays were carried out, initiated with different plants of the generations pseudo-F₄, pseudo-F₅ and pseudo-F₆. The parental genotype resulted a determinant factor in the obtaining of descendants, so the recommendation is the use of the maximum number of different genotypes, in order to maximize the probability of obtaining progeny. A proof of different culture media was carried out, which allowed the selection of the better combination of auxins and cytokinins to grow immature seed and regenerate plants. The effect of the number of days from pollination to fruit harvest was studied, with different results in the three essays. It is not possible to attribute differences found only to this factor, so it would be necessary to carry out a more precise assay controlling other factors, such as the size of the flowers in the moment of the pollination. Two factors, the selection of the immature seeds in more advanced developmental stage as well as the fact to make a small cut in the chalazal region of the seeds, to facilitate the development of the embryo, allowed the increasing of the efficiency in the obtaining of regenerated plants. The predominant response in the first assay was the formation of callus, while in the second and the third the direct regeneration was more frequent. Possibly, the highest genetic similarity to cultivated tomato of the generations employed in the assays 2 and 3 could be the explanation to these results.

A total of 77, 365 and 339 plants, were obtained in each one of the assays, respectively. Many of these plant materials have been acclimated and phenotyped, and in several cases the obtaining of seeds from selfing, that germinated normally, was possible. These results indicate that it is possible to continue with the construction of the collection of ILs without the need to use immature seed rescue for these more advanced generations. The genotyping of the available materials will allow the identification of regions not represented in these generations, so the need to use previous generations to cover these regions.

As mentioned before, the collection of ILs results of interest, given the resistance of the donor parental to TYLCD, among others traits. Once the collection is completed, it will be evaluated for its resistance to this disease. The previous studies showed that it is probably a quantitative resistance, whose expression is often more dependent of the environmental conditions and of other factors. In these cases, the use of only one resistant and one susceptible control is not sufficient to determine with accuracy the level of resistance. Availability of controls with different levels of resistance would allow a more precise phenotyping. A group of researchers of the “Volcani Center” developed a scale

that consisted of seven lines with different levels of resistance to TYLCD, introgressed from different wild species. In this work, the response of this scale in seven distinct assays was evaluated, four of them carried out in the COMAV-UPV and the others three in the “Instituto Nacional de Ciencias Hortícolas de Cuba”. Two isolates of TYLCV (*Tomato yellow leaf curl virus*), one of the species causing TYLCD, different inoculation method, two development stages of the plant and several environmental conditions were evaluated. In general, the symptoms were more slight than the obtained in the conditions assayed by the authors that developed the scale, although the order of the lines in the scale were maintained, with few exceptions. However, in most of the conditions, the response obtained did not correspond to a graded scale, since there were high differences among the symptom scores of the susceptible and the resistant lines, with very small the differences among the resistant lines. These results suggest the possibility to reduce the number of lines to employ in each concrete condition, selecting the most susceptible, the most resistant and another with intermediate levels of resistance.

Versión en valenciano

L'entrada PI 126944 de *S. peruvianum* ha sigut descrita com a resistent a diferents estresses biòtics, entre ells a la malaltia de l'arriçat groc de la tomaca (Tomato yellow leaf curl disease, TYLCD) i al virus del bronzejat de la tomaca (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV). En treballs previs realitzats en el “Instituto Universitario para la Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana” (COMAV) es van obtenir tres híbrids interespecífics entre aquesta entrada i la tomaca cultivada, emprant el rescat de llavors immadures. En treballs posteriors, també emprant rescat d'embrions o de llavors immadures, es van desenvolupar generacions més avançades a partir d'aquests materials, incloent fins a les generacions pseudo-F₆ i retrocreuaments cap a l'espècie cultivada d'algunes de les generacions pseudo-F_n. En el transcurs de l'obtenció d'aquestes generacions es van provar els materials per la seua resistència a tots dos virus, havent-se demostrat la introgressió amb èxit de la mateixa. A fi de localitzar els gens responsables de la resistència i aprofitar aquests materials en la millora de la tomaca cultivada es va iniciar, en treballs anteriors del grup, el desenvolupament d'un conjunt de línies d'introgressió (*Introgression lines*, ILs) que continguen el genoma de l'entrada PI 126944 en el fons genètic de *S. lycopersicum*. Per a tenir correctament representat el genoma de

l'espècie donant en el fons genètic de la tomaca és necessari obtenir un gran nombre de descendents, per la qual cosa és necessari optimitzar els protocols fins llavors emprats per a aconseguir materials avançats derivats d'aquesta entrada.

En aquest sentit, el primer objectiu d'aquesta tesi va ser l'estudi de diferents factors implicats en la superació de les barreres d'incompatibilitat, a fi d'aconseguir un elevat nombre de descendents i maximitzar la probabilitat d'introgressar el genoma de PI 126944 en el conjunt de ILs. Es van dur a terme tres assajos de retrocreuament, iniciats amb diferents plantes de les generacions pseudo-F₄, pseudo-F₅ i pseudo-F₆. El genotip dels parentals va resultar un factor determinant en l'obtenció de descendència, per la qual cosa es recomana utilitzar el màxim nombre de genotips diferents, a fi de maximitzar la probabilitat d'obtenir descendència. Es va dur a terme una prova de medis de cultiu que va permetre seleccionar la combinació més adequada d'auxines i citoquinines per al cultiu de llavors immadures i posterior regeneració de plantes. Es va estudiar l'efecte del nombre de dies transcorreguts des de la pol·linització fins a la recol·lecció dels fruits, havent-se obtingut resultats diferents en els tres assajos. Atès que resulta difícil atribuir únicament a aquest factor les diferències, seria necessari realitzar un assaig més precís controlant altres factors, tals com la grandària de les flors en el moment de la pol·linització. Es va comprovar que tant la selecció de les llavors immadures amb major desenvolupament com la realització d'un tall en la coberta de les llavors, a fi de facilitar el desenvolupament de l'embrió, van permetre incrementar l'eficiència en l'obtenció de plantes regenerades. La via majoritària de regeneració en el primer assaig va ser la formació de calls, si bé en el segon i el tercer va ser més freqüent la regeneració directa. Possiblement, la major proximitat genètica amb la tomaca cultivada de les generacions emprades en els assajos 2 i 3 expliquen aquests resultats.

Es van obtenir un total de 77, 365 i 339 plantes, en cadascun dels assajos, respectivament. Molts d'aquests materials han sigut aclimatats i fenotipats, havent-se comprovat que en molts casos ha sigut possible obtenir llavor d'autofecundació que ha germinat normalment. Aquests resultats indiquen que és possible continuar amb la construcció de la col·lecció de ILs prescindint del cultiu de llavors per a aquestes generacions més avançades. El genotipat dels materials disponibles permetrà determinar la necessitat de recórrer a generacions anteriors per a cobrir les regions del genoma no representades en les generacions obtingudes.

Tal com s'ha comentat anteriorment, aquesta col·lecció de ILs presenta interès per la resistència del parental donant a TYLCD, entre altres caràcters. Una vegada es complete la col·lecció, s'avaluarà per la seua resistència a aquesta malaltia. Els estudis previs han mostrat que es tracta probablement d'una resistència quantitativa, l'expressió de la qual sovint és més dependent de les condicions ambientals i d'altres factors. En aquests casos, l'utilització d'un sol control resistent i un altre susceptible no és suficient per a determinar amb exactitud el nivell de resistència dels materials en estudi. La disponibilitat de controls amb diferents nivells de resistència permetria realitzar un fenotipat més precís. Un grup d'investigadors del “Volcani Center” van desenvolupar una escala composta per set línies amb diversos nivells de resistència a TYLCD, introgressada a partir de diferents espècies silvestres. En el marc d'aquesta tesi es va avaluar el comportament d'aquesta escala en set assajos diferents, quatre d'ells duts a terme en el COMAV-UPV i els altres tres en el “Instituto Nacional de Ciencias Hortícolas de Cuba”. Es van comparar dos aïllats de TYLCV (*Tomato yellow leaf curl virus*), una de les espècies causants de TYLCD, diferents mètodes d'inoculació, dos estats de desenvolupament de la planta i diferents condicions ambientals. En general, els símptomes van ser més lleus que els obtinguts en les condicions assajades pels autors que van desenvolupar l'escala, si ben l'ordre de les línies en l'escala es va mantenir, amb poques excepcions. No obstant açò, en la major part de les condicions, la resposta obtinguda no va correspondre a una escala gradual, ja que es va observar una gran diferència entre els valors de símptomes de les línies susceptibles i les resistents, sent molt similar la resposta de les línies resistents. Aquests resultats suggereixen la possibilitat de reduir el nombre de línies a emprar en cada condició concreta, seleccionant la més susceptible, la més resistent i alguna amb nivells intermedis de resistència.

INTRODUCCION

1. Taxonomía del tomate y especies silvestres relacionadas

Desde que el tomate fue introducido en Europa durante el siglo XVI y principios del siglo XVII se reconocieron sus estrechas relaciones con el género *Solanum*, recibiendo el nombre de *Solanum pomiferum* o “Apple-bearing nightshade”. Su situación taxonómica dentro de las *Solanáceas* siempre ha sido clara, aunque no así su género, el cual ha adoptado diversas clasificaciones.

En 1694, Tournefort consideró al tomate cultivado como una entidad distinta a nivel de género, utilizando el término griego *Lycopersicon*. Incluyó las plantas con frutos multiloculares en el grupo denominado *Lycopersicon* y mantuvo las plantas con frutos biloculares en el grupo *Solanum*. Sin embargo, Linnaeus (1753) clasificó al tomate cultivado dentro del género *Solanum*. Un año más tarde, Miller (1754) separó ambos géneros, pasando el tomate a ser clasificado como *Lycopersicon esculentum*, por sus características diferenciales de las hojas y las anteras.

Rick (1979), agrupó las nueve especies pertenecientes al género *Lycopersicon* en dos complejos según su cruzabilidad con el tomate cultivado, en el complejo *esculentum* incluyó siete especies: *L. esculentum*, *L. pimpinellifolium*, *L. cheesmaniae*, *L. chmielewskii*, *L. parviflorum*, *L. hirsutum* y *L. pennellii*, mientras que en el complejo *peruvianum* englobaba las especies *L. chilense* y *L. peruvianum*. En 1990, Child, basándose en criterios morfológicos, ubicó de nuevo al tomate cultivado dentro del género *Solanum*. Los estudios moleculares y morfológicos más actuales apoyan la ubicación del tomate cultivado dentro del género *Solanum*, pasándose a denominar *Solanum lycopersicum* L. (Peralta y Spooner, 2000).

Las especies taxonómica y genéticamente relacionadas con el tomate se agrupan dentro del género *Solanum*, en las secciones *Lycopersicon*, *Juglandifolium* y *Lycopersicoides* (Peralta *et al.*, 2008). La sección *Lycopersicon* incluye a *Solanum lycopersicum*, la única especie cultivada, y a las 12 especies silvestres más genéticamente relacionadas, mientras que las secciones *Lycopersicoides* y *Juglandifolium* incluyen especies más alejadas del tomate (Tabla 1).

Todas las especies relacionadas con el tomate son diploides y similares en el número y estructura de los cromosomas ($2n = 2x = 24$) (Rick y Butler, 1956).

Tabla 1. Clasificación de las especies relacionadas con el tomate dentro del género *Solanum* (Peralta et al., 2008).

Sección <i>Lycopersicon</i>	
Grupo <i>Lycopersicon</i>	<i>S. lycopersicum</i> L.
	<i>S. pimpinellifolium</i> L.
	<i>S. cheesmaniae</i> (L. Riley) Fosberg
	<i>S. galapagense</i> S. Darwin & M.I. Peralta
Grupo <i>Neolycopersicon</i>	
Grupo <i>Eryopersicon</i>	<i>S. pennellii</i> Correll
	<i>S. chilense</i> (Dunal) Reich
	<i>S. corneliomuelleri</i> J.F. Macbr.
	<i>S. habrochaites</i> S. Knapp & D.M. Spooner
	<i>S. huaylasense</i> Peralta & S. Knapp
Grupo <i>Arcanum</i>	<i>S. peruvianum</i> L.
	<i>S. arcanum</i> Peralta
	<i>S. chmielewskii</i> (C.M. Rick, keisicki, Fobes&M.Holle) D.M. Spooner, G.J Anderson & R.K. Jansen
	<i>S. neorickii</i> D.M. Spooner, G.J Anderson & R.K. Jansen
Sección <i>Lycopersicoides</i>	
	<i>S. lycopersicoides</i> Dunal
	<i>S. sitiens</i> I.M. Johnst
Sección <i>Juglandifolium</i>	
	<i>S. juglandifolium</i> Dunal
	<i>S. ochrantum</i> Dunal

Las especies que presentan mayor variabilidad genética son *S. chilense*, *S. habrochaites*, *S. peruvianum* y *S. pennellii*, mientras que las menos variables son *S. cheesmaniae* y *S. pimpinellifolium*.

Todas las especies de la sección *Lycopersicon* tienen flores hermafroditas, presentando, sin embargo, diferentes sistemas reproductivos. *S. cheesmanii* y *S. parviflorum* son especies autocompatibles autógamas, mientras que la mayor parte de las entradas de *S. chilense*, *S. habrochaites*, *S. peruvianum* y *S. pennellii* son autoincompatibles, y por tanto alógamas obligadas. Existen también especies autocompatibles, con distintos grados de alogamia facultativa, como es el caso de *S. chmielewskii*, *S. lycopersicum* y *S. pimpinellifolium* (Rick 1987).

La autoincompatibilidad en el género *Solanum* y en otras *Solanáceas* es de tipo gametofítico, produciéndose el aborto del polen a nivel del estilo, aun cuando la germinación se haya iniciado (Franklin-Tong y Franklin, 2003). A nivel genético, esta SI

es controlada por el locus *S*, que produce S-RNAsas en el pistilo, las cuales rechazan el polen procedente de la misma flor (McClure et al., 1989). El factor de reconocimiento del polen, una proteína con caja F, codificada por el locus *S* (Qiao et al., 2004; Sijacic et al., 2004), interacciona aparentemente con la S-RNasa del estilo dentro del tubo polínico para provocar (en el caso de incompatibilidad) o evitar (en el caso de compatibilidad) la degradación del ARN del tubo polínico (Kao y Tsukamoto, 2004; Qiao et al., 2004).

En cruces interespecíficos entre el tomate y las especies silvestres relacionadas suele producirse incompatibilidad unilateral (*unilateral incompatibility*, UI), de forma que los pistilos de las especies autoincompatibles rechazan el polen de las especies autocompatibles, pero no al revés (Lewis y Crowe, 1958; de Nettancourt, 2001). Algunos estudios de rechazo del tubo polínico como consecuencia de la UI, empleando especies silvestre de tomate como parentales femeninos y polen de la especie cultivada, encontraron que hay al menos dos modos de rechazo del polen por UI, rechazo temprano y rechazo tardío, difiriendo ambos del mecanismo de rechazo en los sistemas de SI. En concreto, Covey et al. (2010) describieron que la expresión de S-RNAsas no es necesaria para el modo temprano o tardío de rechazo del polen en la UI. Estudios posteriores han permitido comprobar que las proteínas HT están implicadas en los mecanismos de UI tanto dependientes como independientes de S-RNAsas (Tóvar-Méndez et al., 2017).

En cualquier caso, las relaciones de cruzabilidad con las distintas especies silvestres relacionadas limitan el empleo de estas especies en mejora. En este sentido, los cruces realizados entre el tomate cultivado y las especies de la sección *Lycopersicon* son posibles, pero con ciertas diferencias en el grado de cruzabilidad (Figura 1). *S. lycopersicum* cruza con mucha facilidad con *S. cheesmaniae*, *S. pimpinellifolium* y *S. galapagense*, mientras que las especies *S. neorickii*, *S. chmielewskii*, *S. habrochaites* y *S. pennellii* cruzan con menos facilidad. Para la obtención de híbridos resultantes del cruce entre tomate y *S. chilense* o *S. peruvianum* se requiere normalmente el empleo de técnicas especiales, tales como el rescate y posterior cultivo de embriones inmaduros.

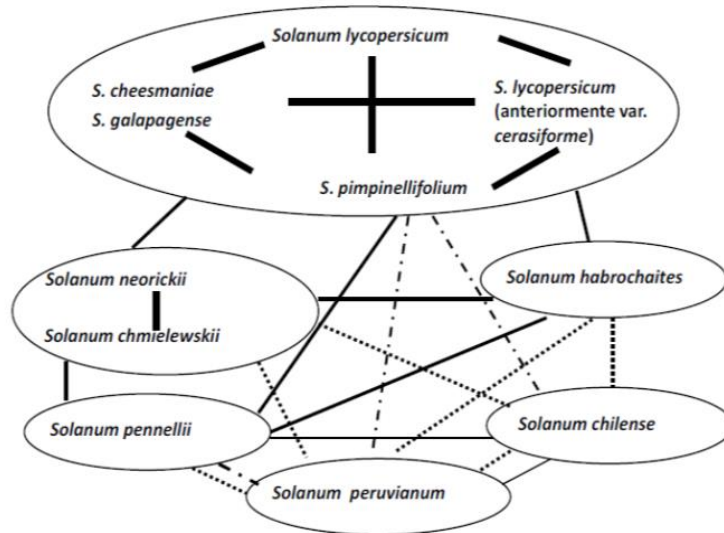


Figura 1. Diagrama de cruzabilidad del tomate cultivado con las especies silvestres relacionadas. Las barras sólidas conectan especies entre las que se producen cruces compatibles y su grosor indica el grado de cruzabilidad. Las barras discontinuas indican cruces que pueden superarse por el cultivo de embriones, y las líneas de puntos indican cruces fallidos. Fuente: Díez y Nuez (2008).

Las especies pertenecientes a las secciones *Lycopersicoides* y *Juglandifolium* son las más distantes del tomate cultivado, por lo tanto, las barreras reproductivas existentes dificultan su uso como material para aprovechar sus características de interés (Peralta y Spooner, 2005). Sin embargo, con *S. lycopersicoides* y *S. sitiens* se han obtenido híbridos interespecíficos empleando distintos métodos que han permitido superar las barreras de incompatibilidad, constituyendo de esta manera a su utilización en la mejora del tomate cultivado (Chetelat y Meglic, 2000; Pertuzé et al., 2003; Chetelat, 2016).

2. Utilización de las especies silvestres en mejora

La variabilidad genética presente en el tomate cultivado es limitada como consecuencia de los cuellos de botella sufridos durante los procesos de domesticación. Su traslado a Europa y los primeros trabajos de selección y mejora genética contribuyeron más tarde esta disminución de la base genética (Blanca et al, 2012; 2015). Estudios moleculares demuestran que la especie cultivada contiene menos del 5% de la variabilidad genética presente en las especies silvestres (Miller y Tanksley, 1990).

La mejora genética del tomate comenzó en Europa poco después de su llegada desde América. Esta mejora inicial consistió en la hibridación entre los cultivares

entonces existentes y la selección posterior en busca de nuevas variedades más productivas y adaptadas a las condiciones climáticas y técnicas de cultivo propias de un nuevo continente. La adecuación a los diferentes tipos de usos fue un importante objetivo de mejora (Bai y Lindhout, 2007). Distintas evidencias sugieren que no se produjeron introgresiones de especies silvestres en el fondo genético de la especie cultivada antes de 1940. De hecho, Rick fue el primer investigador que observó la variación surgida en la descendencia de cruces entre especies silvestres y el tomate cultivado, siendo desde entonces las especies silvestres una fuente fundamental de características de interés en la mejora de la especie cultivada (Bai y Lindhout, 2007).

Algunas de las especies silvestres relacionadas con el tomate crecen en áreas con condiciones climáticas adversas en cuanto a temperatura o sequía. Aunque, si bien se han identificado fuentes de tolerancia a la sequía, salinidad o frío, su aprovechamiento ha sido bajo, debido al control genético complejo de estos caracteres.

En cuanto a la mejora para la calidad del fruto, las especies más utilizadas han sido *S. pimpinellifolium*, *S. pennellii*, *S. cheesmaniae* y *S. habrochaites* (Grajera et al., 2006; Roselló y Nuez 2006). Se han identificado e introducido en el fondo genético del tomate distintos QTLs relacionados con aspectos de calidad tales como sólidos totales, acidez, color del fruto, contenido nutricional, compuestos volátiles, etc.

En cualquier caso, las especies silvestres han sido especialmente aprovechadas desde hace décadas como poseedoras de genes de resistencia a patógenos y enfermedades (Tabla 2). Las más estudiadas para su utilización como fuentes de resistencia a enfermedades y patógenos han sido *S. pimpinellifolium*, *S. pennellii*, *S. habrochaites*, *S. peruvianum* y *S. chilense* (Foolad, 2007).

Tabla 2. Principales genes de resistencia a diversos patógenos y las especies donde han sido identificados (Soler y Nuez, 2004)

Patógeno	Fuente de resistencia	Locus
Virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV)	<i>S. chilense</i>	<i>Ty1, Ty3, Ty4</i>
	<i>S. habrochaites</i>	<i>Ty2</i>
	<i>S. peruvianum</i>	<i>ty5</i>
Virus del bronceado del tomate (TSWV)	<i>S. peruvianum</i>	<i>Sw-5</i>
Virus del mosaico del tomate (ToMV)	<i>S. habrochaites</i>	<i>Tm1</i>
	<i>S. peruvianum</i>	<i>Tm22</i>
<i>Verticillium dahliae</i> y <i>Verticillium alboatrum</i>	Ils de <i>S. pennelli</i>	<i>Ve</i>
	<i>S. pimpinellifolium</i>	<i>I1</i>
<i>Fusarium oxysporum</i>	Hibrido entre <i>S. lycopersicum</i> × <i>S. pimpinellifolium</i>	<i>I2</i>
	<i>S. pennellii</i>	<i>I3</i>
	<i>S. peruvianum</i>	<i>I7</i>
<i>Phytophthora infestans</i>	<i>S. pimpinellifolium</i>	<i>Ph1, Ph2, Ph3</i>
<i>Cladosporium fulvum</i>	<i>S. pimpinellifolium</i>	<i>Cf2, Cf9</i>
	<i>S. habrochaites</i>	<i>Cf4, Cf4E</i>
	<i>S. lycopersicum</i>	<i>Cf5</i>
<i>Meloidogyne</i> spp.	<i>S. peruvianum</i>	<i>Mi-1, Mi-1.2</i>
	<i>S. lycopersicum</i>	<i>Rx-3, Bs4, QTL</i>
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	<i>S. pimpinellifolium</i>	<i>Rx-4</i>
	<i>S. lycopersicum</i> y <i>S. pimpinellifolium</i>	<i>Xv3</i>
	<i>S. pennellii</i>	<i>Xv4=RXopJ4</i>
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	<i>S. lycopersicum</i>	<i>Pto</i>

En muchos casos, con el objetivo de aprovechar la resistencia que proporcionan estas especies, se han desarrollado marcadores moleculares asociados a estos caracteres de interés. Estos marcadores se emplean en la selección asistida por marcadores (MAS, *Marker assisted selection*) en el contexto de los programas de mejora (Bai y Lindhout, 2007; Pérez de Castro et al., 2012).

2.1. Utilización de *Solanum peruvianum* en la mejora del tomate

S. peruvianum es considerada la especie silvestre de la sección *Lycopersicon* más distante al tomate cultivado, pero también la más variable, lo que la convierte en un gran recurso para la mejora. Se trata de una especie autoincompatible y generalmente incompatible con el tomate, aunque algunas entradas presentan un mayor grado de compatibilidad, pudiéndose conseguir frutos con escaso número de semillas. En cualquier caso, en general, en los cruces entre *S. lycopersicum* y *S. peruvianum* existen varias

barreras postcigóticas que afectan el desarrollo y viabilidad de las semillas: los embriones abortan y las semillas no llegan a desarrollarse completamente, siendo incapaces de madurar (Barbano y Topoleski, 1984; Fulton et al., 1997a). Con objeto de superar las barreras de cruzabilidad entre estas dos especies se han utilizado diversas técnicas de cultivos de tejidos, entre ellas se puede mencionar el cultivo de embriones (Smith, 1944) y el cultivo de semillas inmaduras (Imanishi et al., 1985).

S. peruvianum sido descrita como tolerante a la sequía y también como poseedora de genes de resistencia para determinados estreses bióticos. Distintas entradas de esta especie han sido identificadas como portadoras de genes de resistencia a enfermedades. Entre ellos, cabe destacar el gen *Pyl*, que proporciona resistencia al hongo *Pyrenochaeta lycopersici* (Laterrot, 1978), los genes *Mi*, que confieren resistencia a nematodos del género *Meloidogyne* (Gilbert, 1958) y los genes *Tm-2* (Laterrot y Pecaut, 1969) y *Tm-2²* (Hall, 1980) de resistencia al virus del mosaico del tomate (*Tomato mosaic virus*, ToMV).

De especial interés resulta la entrada PI 126944, que ha sido descrita como resistente al virus del mosaico del tabaco (*Tobacco mosaic virus*, TMV) (Yamakawa y Nagata, 1975), al virus del bronceado del tomate (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) (Paterson et al., 1989) y al virus del rizado amarillo del tomate (*Tomato yellow leaf curl virus* TYLCV) (Picó et al., 1998; Pilowsky y Cohen, 2000), así como al hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Rowe y Farley, 1981).

En 2002, Picó et al. obtuvieron tres híbridos interespecíficos entre la entrada PI 126944 y el tomate cultivado. A partir de estos híbridos se desarrollaron distintas generaciones que fueron evaluadas por su resistencia a TYLCV y TSWV, habiéndose comprobado que la resistencia se mantiene en algunos de los materiales derivados (Pérez de Castro et al., 2008a; Julián et al., 2013). Con objeto de localizar los genes responsables de la resistencia y aprovechar estos materiales en la mejora del tomate cultivado, se ha iniciado el desarrollo de un conjunto de líneas de introgresión que contengan el genoma de la entrada PI 126944 en el fondo genético de *S. lycopersicum* (Julián et al., 2013).

3. Poblaciones de premejora

Tradicionalmente la introgresión de los genes de interés procedentes de las especies silvestres en el fondo genético de las especies cultivadas se ha llevado a cabo desarrollando inicialmente el híbrido interespecífico, para posteriormente recuperar el

fondo genético de la especie cultivada mediante retrocruzamientos sucesivos. Esta forma de introgresión es costosa y lenta, de forma que la tendencia actual es aprovechar el proceso para desarrollar poblaciones de premejora.

Las poblaciones de premejora son conjuntos de líneas que poseen cada una de ellas uno o varios fragmentos cromosómicos de la especie silvestre en el fondo genético de la especie cultivada (Zamir, 2001). Se obtienen partiendo del cruce inicial entre un parental donante de la especie silvestre de interés y un parental recurrente de la especie cultivada, seguido de varias generaciones de retrocruzamiento y/o autofecundación. La obtención de este tipo de poblaciones requiere de largos procesos, pero en muchos casos presentan la ventaja de ser perpetuables, además de poder ser incorporadas directamente en programas de mejora. Las poblaciones de premejora han permitido el cartografiado de genes y locus de un carácter cuantitativo (QTLs; *Quantitative Trait Loci*), y han facilitado su introgresión en distintas especies.

Existen diferentes tipos de poblaciones de premejora, cada una de ellas desarrolladas mediante un diseño de cruzamientos concreto. A continuación, se describen algunas de ellas.

3.1. Líneas recombinantes consanguíneas

Las líneas recombinantes consanguíneas (*Recombinant Inbred Lines*, RILs) se forman por autofecundación de un híbrido obtenido inicialmente de un cruce intrespecífico, para dar lugar a una generación F₂. Los individuos heterocigotos obtenidos de esta generación F₂ se autofecundan para dar lugar a la formación de un conjunto de líneas estables homocigóticas para prácticamente todos sus loci (Bailey, 1971). Las plantas así obtenidas difieren entre sí en la combinación de alelos de los parentales (Figura 2).

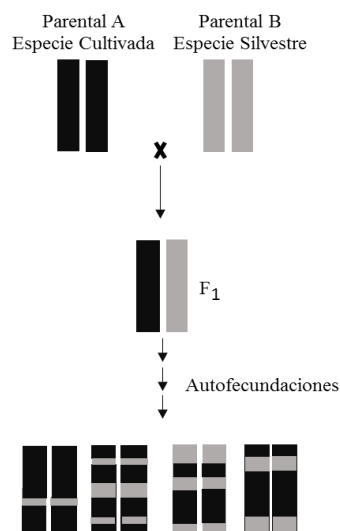


Figura 2. Esquema de obtención de líneas recombinantes consanguíneas (RILS).

Este conjunto de individuos homocigóticos constituye una población autopertuante que permite su evaluación en diferentes ambientes, si bien presentan la desventaja de que cada planta contiene una elevada proporción genética del parental silvestre, dificultando la evaluación de determinados caracteres. En algunos casos no es posible desarrollar RILs, ya que aparecen barreras de cruzabilidad en las primeras generaciones F_1 que dificultan las autofecundaciones iniciales siguientes. Este fenómeno podría deberse a la presencia de una alta proporción de genoma de la especie silvestre en la línea obtenida (Paran et al., 1995).

3.2. Poblaciones de retrocruces avanzados

Las poblaciones de retrocruces avanzados (*Advanced Backcross*, AB) se obtienen retrocruzando un híbrido inicial F_1 hacia el parental recurrente. La generación resultante (BC_1) es retrocruzada una y otra vez hasta llegar al genotipo deseado. En cada generación se realizan selecciones para eliminar plantas con características no deseables derivadas del parental exótico. Suponen una alternativa cuando no es posible desarrollar RILs como consecuencia de la esterilidad del híbrido interespecífico. Empleando este tipo de poblaciones se desarrolló una estrategia para descubrimiento y transferencia simultáneos de QTLs valiosos desde los parientes silvestres a la especie cultivada, estrategia conocida como AB-QTL (Tanksley y Nelson, 1996).

3.3. Generación de retrocruces avanzados con autofecundaciones

Una variante a las poblaciones de retrocruces avanzados, está constituida por las generaciones de retrocruces avanzados con autofecundaciones (*Backcross Recombinant Inbred Lines*, *BCRILs*, también conocidas como *Backcross Inbred Lines*, *BILs*). Este método fue propuesto por Wehrhahn y Allard (1965) para la introgresión de caracteres cuantitativos y la estimación del número de genes. En este tipo de poblaciones el híbrido inicial se retrocruza con el parental recurrente hasta recuperar aproximadamente entre el 75% y el 90% del genoma. Posteriormente se autofecunda durante varias generaciones para fijar las introgresiones en homocigosis por línea (Figura 3).

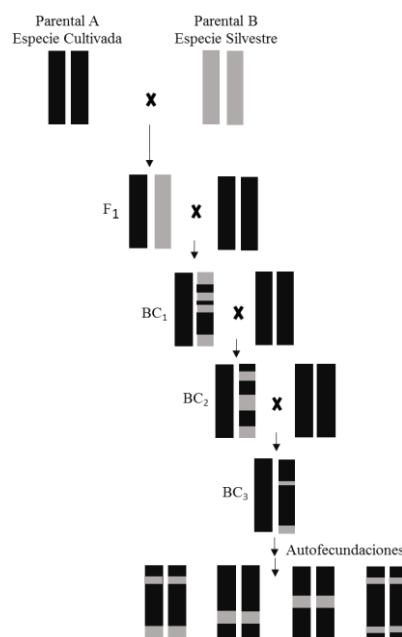


Figura 3. Esquema de obtención de las BILs.

Una ventaja de este tipo de poblaciones es que las autofecundaciones, incrementan el nivel de homocigosis, de este modo se obtiene un conjunto de líneas genéticamente más estables respecto a otras generaciones como los retrocruces o las generaciones las F₂/F₃. Por otro lado, los fragmentos cromosómicos del parental silvestre en el fondo genético del parental cultivado son más pequeños por lo que la detección y el mapeado de QTLs resulta más eficiente (Monforte y Tanksley, 2000).

3.4. Líneas de introgresión

Una colección de líneas de introgresión (*Introgression Lines, ILs*;) se caracteriza porque cada línea contiene un fragmento cromosómico, a ser posible en homocigosis, y claramente definido, del donante silvestre sobre el fondo genético de la especie cultivada. Este tipo de poblaciones son más avanzadas que las anteriores, ya que se realizan más generaciones de retrocruce, por lo tanto, los fragmentos introgresados en las líneas son más pequeños. El objetivo final del proceso será obtener el genoma de la especie silvestre introgresado en pequeños fragmentos en el genoma de la especie cultivada (Zamir, 2001). Cada una de las ILs así obtenidas constituye una línea casi isogénica (*Near isogenic line, NIL*) con respecto al parental recurrente. Para la obtención de las ILs, a partir de la F₁ se realizan retrocruces hacia el parental recurrente, seguidos de varias generaciones de autofecundación. El objetivo de este procedimiento es obtener un solo fragmento del parental silvestre por línea en homocigosis (Figura 4).

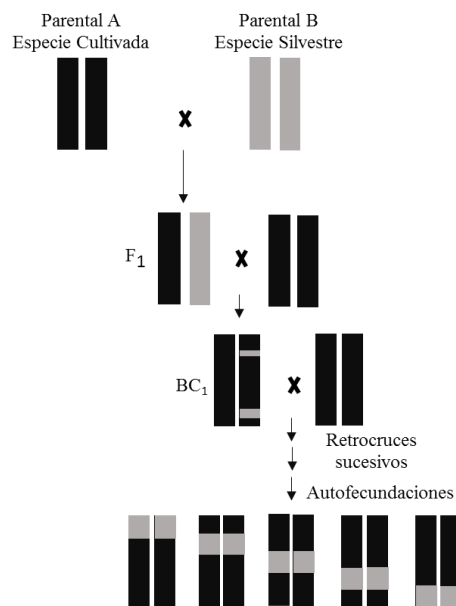


Figura 4. Esquema de obtención de las ILs.

La principal ventaja de las ILs sobre las demás poblaciones radica en el hecho de que cada línea posee idealmente un solo fragmento del parental silvestre por línea, por lo que es posible hacer una relación directa entre el fenotipo observado con el fragmento introgresado.

El largo proceso de obtención de estas poblaciones de premejora constituye su principal inconveniente. Además, el estudio de caracteres determinados por más de un

gen o QTL resulta más difícil; por este motivo cuando se utilizan las ILs es preferible elegir caracteres simples que no dependan de muchos genes (Canady et al., 2005).

3.5. Poblaciones de premejora desarrolladas con especies silvestres relacionadas con el tomate

En tomate existen diversas poblaciones de premejora derivadas de especies silvestres relacionadas. Las especies que han sido utilizadas más extensamente son *S. pennellii*, *S. habrochaites* y *S. pimpinellifolium*, debido a su cercanía al tomate y a que presentan buena cruzabilidad (Foolad, 2007). Sin embargo, incluso con especies más alejadas ha sido posible generar este tipo de poblaciones.

En 1995, Eshed y Zamir desarrollaron una población de 50 líneas de introgresión obtenidas a partir de un cruce entre el tomate cultivado y *S. pennelli* LA716, consiguiéndose una completa cobertura del genoma de la especie silvestre. Esta población se ha utilizado para mapear QTLs relacionados con distintas características relacionadas con el peso del fruto (Alpert y Tanksley, 1996) y con parámetros de calidad (Ronen et al., 2000), además de para el estudio de la relación entre el grado de ejerción del estigma y el grado de autopolinización (Chen y Tanksley, 2004). En 1999, la población se amplió a 76 líneas, permitiéndose la identificación de hasta 2975 QTLs. Subsecuentemente, se han desarrollado 500 sub-ILs, mejorando la resolución del mapeo. Debido a la alta variabilidad fenotípica, las ILs de *S. pennellii* han sido utilizadas para explorar las bases genéticas y moleculares de la adaptación ambiental, la biología reproductiva, y han demostrado ser una herramienta poderosa para descubrir los loci que gobiernan la heterosis (Lippman et al., 2007).

Con respecto a *S. pimpinellifolium*, Doganlar et al. (2002) desarrollaron una población de BILs a partir de la entrada LA1589, obteniendo 196 líneas BC₂F₆. Para un mejor manejo de las líneas se seleccionó un subconjunto de 100 líneas representando el genoma completo de la especie silvestre. En este estudio se identificaron numerosos QTLs para rasgos de importancia agronómica, incluyendo loci para la forma, firmeza y color del fruto, crecimiento de las plantas, fertilidad y tiempo de floración.

Ashrafi et al. (2009) desarrollaron una población de RILs a partir del cruce entre la entrada LA2093 de *S. pimpinellifolium* y *S. lycopersicum*. Esta población permitió construir un mapa de ligamiento usando 294 marcadores polimórficos, incluyendo polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (*Restriction Fragment*

Length Polymorphism, RFLP), marcadores de secuencias expresadas (*Expressed Sequence Tag*, EST), secuencias polimórficas amplificadas y cortadas (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*, CAPS) y microsatélites (*Simple Sequence Repeat*, SSR). Esta población y el mapa desarrollado a partir de la misma han permitido estudiar QTLs asociados a resistencias a estreses bióticos y abióticos y contenido en licopeno de los frutos (Ashrafi et al., 2009).

Con la entrada TO-937 de *S. pimpinellifolium*, Barrantes et al. (2014), desarrollaron un conjunto de ILs. La población final estuvo compuesta por 53 ILs, lográndose la cobertura del 94% del parental donante. Este conjunto de ILs se ha utilizado para cartografiar QTLs relacionados con caracteres agronómicos de interés y caracteres relacionados con la calidad del fruto.

A partir de la entrada GI.1554 de esta especie se desarrolló una población de RILs que ha sido explotada para la identificación de resistencia a la enfermedad del rizado amarillo del tomate (Tomato yellow leaf curl disease, TYLCD) (Viquez-Zamora et al., 2014).

Utilizando la especie silvestre *S. habrochaites*, Monforte y Tanksley (2000) desarrollaron una población de NILs y BCRILs a partir del cruce entre *S. lycopersicum* cv. E6206 y la accesión LA1777 de *S. habrochaites*. La mayor parte de las líneas eran portadoras de una sola introgresión definida de *S. habrochaites* en el fondo genético del tomate cultivado, con una cobertura total de 85% del genoma de la especie silvestre.

La entrada LA407 de *S. habrochaites* se utilizó en la construcción de una población de ILs. Se obtuvieron 64 líneas derivadas del cruce entre *S. lycopersicum* y *S. habrochaites*, en las cuales la contribución teórica de *S. habrochaites* a cada línea fue del 12,5%, además cada línea contenía un 87,5% del genoma de *S. lycopersicum*. La población fue probada para resistencia a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y los resultados demostraron una resistencia parcial a la bacteria, sujeta a la variación ambiental (Francis et al., 2001). La evaluación de 62 de estas líneas por resistencia a la podredumbre de la raíz causada por *Phytophthora capsici* ha permitido localizar un conjunto de genes relacionados con la resistencia y con respuestas de defensa (Quesada-Ocampo et al., 2016).

A pesar de las barreras de cruzabilidad entre el tomate cultivado y otras especies silvestres más alejadas filogenéticamente, ha sido posible generar poblaciones de

premejora con algunas de ellas. Canady et al. (2005) desarrollaron, a partir de un híbrido entre *S. lycopersicum* (VF36) y *S. lycopersicoides* (LA2951) (Chetelat et al., 1997), un conjunto de 272 líneas de introgresión de *S. lycopersicoides* en el fondo genético del tomate cultivado. Durante la construcción de las líneas se utilizaron marcadores RFLPs, de tipo morfológico y aloenzimas para la identificación de los fragmentos de *S. lycopersicoides*. Muchas de las ILs se mantuvieron en heterocigosis, ya que los factores de esterilidad imposibilitaban el mantenimiento del fragmento en homocigosis. En las líneas portadoras del fragmento introgresado en heterocigosis, se observó que en la segregación se producía una distorsión a favor de alelos de *S. lycopersicum*, de modo que algunas introgresiones podrían perderse en las siguientes generaciones. La colección de ILs desarrollada por Canady et al. (2005) ha sido probada para la resistencia al hongo foliar *Botrytis cinerea* (Davis et al., 2009), para la tolerancia a la salinidad (Li et al., 2011), para la resistencia a ToMV (Soler et al., 2012) y para la resistencia a TYLCD (Pérez de Castro et al., 2011; Zong et al., 2012.).

Respecto a *Solanum peruvianum*, aunque hasta el momento no se han conseguido poblaciones avanzadas, se han desarrollado otro tipo de poblaciones. A partir del cruce entre *S. peruvianum* LA1708 y *Solanum lycopersicum* cv E6203 se obtuvo una población de 241 plantas BC₃ que fueron genotipadas con 177 marcadores RFLPs y otros basados en la PCR, para la construcción de un mapa de ligamiento. Algunas regiones de la especie silvestre se perdieron durante los retrocruzamientos, si bien se consiguió representar el 67% del genoma de *Solanum peruvianum* (Fulton et al., 1997a). A partir de la población BC₃ se obtuvo una población de 200 familias BC₄. En este estudio se identificaron 166 QTLs relacionados con 29 caracteres, como el rendimiento, el contenido de sólidos solubles, viscosidad, características de calidad del fruto y otras características de interés agronómico.

Para los rasgos evaluados se detectaron los QTLs favorables y se realizó una comparación entre los resultados obtenidos para la población desarrollada con *S. peruvianum* y otras poblaciones desarrolladas con *S. pimpinellifolium* y *S. habrochaites*. De los 166 QTLs encontrados en *S. peruvianum*, 31 resultaron en común con una, o con las otras dos poblaciones, por lo tanto, parece probable que la mayoría de los QTLs detectados sean exclusivos del genoma de *S. peruvianum*. En aquellos caracteres de particular interés, como por ejemplo el color del fruto, se observó que los QTLs responsables en *S. peruvianum* y *S. habrochaites* estaban asociados con la disminución

en la intensidad del color rojo, mientras que en *S. pimpinellifolium* estaban asociados con un incremento en la intensidad en el color. Para más de la mitad de los caracteres evaluados, se encontró al menos un QTL en que el alelo de *S. peruvianum* fue superior al del alelo *S. lycopersicum* para ese rasgo (Fulton et al., 1997b). Estos resultados sugieren que es posible identificar alelos con valor agronómico, incluso para características en las que no se observe fenotipo favorable en el parental silvestre. La disponibilidad de poblaciones de premejora facilitará la búsqueda de nuevos genes/alelos de interés para su introgresión en variedades élite.

4. La enfermedad del rizado amarillo del tomate

4.1. Historia de la enfermedad

La enfermedad del rizado amarillo del tomate (Tomato yellow leaf curl disease, TYLCD) es una de las mayores restricciones en la producción de tomate en todo el mundo. TYLCD es causada por un complejo de varias especies de virus que pertenecen al género *Begomovirus*, el más numeroso de la familia *Geminiviridae*. Los primeros registros de un virus de este grupo fueron publicados entre 1939 y 1940 en Israel, donde se describió por primera vez el virus del rizado amarillo del tomate, coincidiendo con el incremento en la población de *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) (Cohen y Antignus, 1994). En 1959, la producción completa de tomate fue destruida en el Valle del Jordán y alrededores debido a un brote de este virus (Cohen y Harpaz, 1964). En Europa comenzaron a aparecer las primeras citas de TYLCD a finales de los ochenta y principio de los noventa, concretamente en Cerdeña en 1988, y posteriormente en Sicilia y el sur de Italia. Como consecuencia del incremento de la población del vector, el intercambio de material vegetal y la evolución de las variantes del virus, la enfermedad se convirtió en una de las más destructivas para la producción de tomate, extendiéndose rápidamente a África, Europa, el Caribe, Estados Unidos, Japón y México (Moriones y Navas-Castillo, 2000; Lefeuvre et al., 2010). En los últimos años, en varias regiones de producción de tomate se han detectado epidemias de TYLCV (Wu et al., 2006, Botermans et al., 2009, Melzer et al., 2010, Van Brunshot et al., 2010, Barboza et al., 2014).

4.2. Organización del genoma del virus

La familia *Geminiviridae* está conformada por cuatro géneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* y *Begomovirus*, que se diferencian entre sí por la organización de sus genomas y por sus vectores. Todos los virus de la familia *Geminiviridae* poseen un genoma de ADN monocatenario (ssADN) de entre 2,5 y 3 kb (Bridson y Stanley, 2009). Aunque la mayoría de los begomovirus tienen genomas bipartitos conformados por dos componentes, designados ADN-A y ADN-B, las especies asociadas a TYLCD poseen un genoma monopartito de aproximadamente 2,7-2,8 kb (Gronenborn, 2007; Hosseinzadeh et al., 2014).

Entre los virus asociados a TYLCD se encuentran 11 especies aceptadas, estando al menos cuatro de ellas asociadas a las epidemias en la cuenca mediterránea: *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) y las especies recombinantes *Tomato yellow leaf curl Malaga virus* (TYLCMaV) y *Tomato yellow leaf curl Axarquia virus* (TYLCAxV) (Díaz-Pendón et al., 2010; Moriones y Navas-Castillo, 2010).

El genoma de las especies asociadas a TYLCD contiene seis marcos de lectura abierta (*Open Reading Frame*, ORFs) que se encuentran solapados y organizados de manera bidireccional: dos se transcriben en el sentido del virión (V1 y V2) y cuatro en el sentido complementario del virión (C1-C4) (Hanley-Bowdoin et al., 1999; Fauquet et al., 2003). Estos ORFs se encuentran separados por una región intergénica, de aproximadamente 300 nucleótidos, que contienen los promotores para la transcripción de los genes virales de sentido y los genes de sentido complementario (Hanley-Bowdoin et al., 1999; Rojas et al., 2005). Los ORFs codifican para la proteína de la cápside CP (ORF V1), la proteína asociada al movimiento del virus MP (ORF V2), la proteína asociada a la iniciación de la replicación Rep (ORF C1), la proteína TrAP (ORF C2), que actúa como un activador transcripcional, la proteína potenciadora de la replicación Ren (ORF C3) y la proteína C4 (ORF C4), que constituye un factor determinante para la expresión de los síntomas y propagación del virus (Gronenborn, 2007).

4.3. Síntomas causados por el complejo de virus causante de TYLCD

Los síntomas que se observan en las plantas infectadas por el complejo de virus causante de TYLCD varían según la cepa del virus, el cultivar, el estado fisiológico de la

planta y las condiciones ambientales (Jordá, 1995). Entre estos síntomas se incluyen rizado y reducción del tamaño de las hojas, pudiendo aparecer también coloración amarilla brillante, moteados y márgenes foliares cloróticos, curvatura de las hojas (confiriéndoles forma de cuchara), reducción del crecimiento, abscisión de la flor y maduración prematura del fruto (Moriones y Navas-Castillo, 2000; Picó et al., 1996).

4.4. Transmisión

En la naturaleza, las especies del complejo TYLCV son transmitidas por la mosca blanca *Bemisia tabaci*. Se han descrito 24 biotipos, que se diferencian por sus características biológicas, tales como la gama de hospedantes, la tasa de reproducción, la adaptabilidad, la eficiencia de transmisión del virus, el grado de inducción de los síntomas fitotóxicos, resistencia a los insecticidas y comportamiento (Brown et al., 1995; Gottlieb et al., 2010; Ning et al., 2015). En diferentes regiones del mundo, las principales epidemias causados por virus transmitidos por la mosca blanca han estado asociadas a las invasiones de *B. tabaci* biotipos B y/o Q (Pan et al. 2012). El biotipo B, originario de Medio Oriente y Asia Menor, tiene una alta fecundidad y una gama de hospedantes muy amplia, mientras que el biotipo Q, originario de la región del Mediterráneo, es capaz de adquirir una mayor resistencia a los insecticidas. Ambos biotipos se consideran los tipos de vectores más importantes y dañinos del cultivo de tomate y son capaces de transmitir TYLCV de manera muy eficiente (De Barro et al., 2011).

Aunque se ha descrito que una sola mosca blanca es capaz de adquirir TYLCV e infectar plantas de tomate, se necesitan entre 15 y 20 moscas blancas por planta para transferir TYLCV y llegar hasta el 100% de eficiencia (Czosnek, 2007; Lapidot, 2007). El insecto adquiere el virus tras alimentarse de la planta, pero éste no se encuentra inmediatamente disponible para la infección. El virus es trasladado desde el tracto digestivo a las glándulas salivales, de las cuales es excretado con la saliva durante la alimentación. La transmisión es de tipo circulativo, no propagativo, donde el virus pasa a través del cuerpo del insecto, presentando dos fases. En la primera fase, la partícula viral entra a través del proceso de ingestión del insecto, se dirige al tracto digestivo por medio de la hemolinfa y penetra las membranas del estómago. La segunda fase consiste en la inoculación del virus, el cual pasa a través de la hemolinfa hacia las glándulas salivares y

finalmente entran al conducto salival. El virus comienza un nuevo ciclo infeccioso cuando se introduce nuevamente en las plantas (Rosell et al., 1999; Ghanim et al., 2001).

El tiempo de adquisición y transmisión del virus está comprendido entre los 15 y 30 minutos, aumentando la tasa de transmisión a medida que aumentan los tiempos de exposición. El período de latencia mínimo en el vector es de entre 17 y 20 horas desde el inicio del periodo de adquisición. La mosca es infecciosa durante un período medio de entre 10 y 12 días después de la adquisición, y en algunas ocasiones continúa siendo infecciosa hasta 20 días, perdiendo progresivamente la infectividad. (Mehta et al., 1994; Caciagli et al., 1995). Por otra parte, la capacidad de transmisión disminuye de manera constante con la edad (Rubinstein y Czosnek, 1997), siendo los vectores machos significativamente menos eficientes que las hembras.

El virus puede transmitirse también por injerto, por agroinoculación o mediante inoculación mecánica, mientras que no se ha descrito la transmisión por suelo (Cohen y Nitzany 1966; Makkouk et al., 1979; Credi et al., 1989; Abdel-Sahun, 1990).

Recientemente se ha descrito la transmisión por semilla, no solo en tomate (Kil et al., 2016), sino también en pimiento (*Capsicum annuum*) (datos no publicados, citado en Kil et al., 2017) y soja (*Glycine max*) (Kil et al., 2017).

4.5. Gama de hospedantes

Los geminivirus transmitidos por mosca blanca tienen una gama pequeña de hospedantes entre las plantas dicotiledóneas (Harrison 1985; Francki et al., 1991). En concreto, las especies asociadas a TYLCD son capaces de infectar a pocas especies de interés agrícola. Sin embargo, el virus puede ser también mantenido en hospedantes silvestres, pudiendo de esta forma sobrevivir entre ciclos de cultivo. En esto radica el interés de conocer las especies silvestres hospedantes (Sánchez-Campos et al., 2000).

Los primeros estudios de transmisión experimental utilizando individuos virulentos de *B. tabaci* mostraron que 13 especies de plantas en las familias *Asclepidaceae*, *Compositae*, *Leguminosae*, *Malvaceae*, *Solanaceae* y *Umbelliferae* eran susceptibles a TYLCV (Cohen y Nitzany, 1966; Cohen y Antignus, 1994). Estudios posteriores identificaron como hospedantes a 104 especies pertenecientes a 24 familias de dicotiledóneas (Dalmon y Marchoux, 2000). Para muchos de estos hospedantes se ha confirmado la infección en condiciones naturales.

A pesar de que los virus asociados a TYLCD afectan principalmente al cultivo de tomate, se han descrito infecciones naturales de la especie TYLCV en otras especies cultivadas como judía (*Phaseolus vulgaris* L.) (Navas-Castillo et al., 1999), berenjena (*Solanum melongena* L.) (Abou-Jawdah et al., 1999), pimiento y especies relacionadas (*Capsicum annuum* L., *C. chinense* Murray, *C. baccatum* L. y *C. frutescens* L.) (Reina et al., 1999; Roye et al., 1999; Salati et al., 2002; Morilla et al., 2005; Polston et al., 2006), lisianthus (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinnery) (Cohen et al., 1995), calabacín (*Cucurbita pepo* L.) (Martínez-Zubiaur et al., 2004), tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) (Font et al., 2005) y soja (Kil et al., 2014).

En cualquier caso, la gama de hospedantes varía en función, no solo de la especie, sino también del aislado considerado (Sánchez-Campos et al., 1999; Monci et al., 2002; Salati et al., 2002; García-Andrés et al., 2006), habiéndose comprobado que las especies recombinantes tienen generalmente una gama más amplia que las no recombinantes de las que proceden (Monci et al., 2002; García-Andrés et al., 2006).

4.6. TYLCD en España

La rápida expansión de TYLCV se debe a la colonización de nuevas áreas geográficas por parte del vector (Brown et al., 1995). En 1992 se detectó en España por primera vez la especie TYLCSV en Murcia (Moriones et al., 1993) y Almería (Reina et al., 1994). En 1997, la especie TYLCV fue detectada en Almería (Navas-Castillo et al., 1997). Actualmente la enfermedad se encuentra extendida tanto en la península (Font et al., 2007), como en las islas Canarias (Font et al., 2000; Monci et al., 2000) y las islas Baleares (Font et al., 2002).

Si bien ambas especies coexisten en España, se ha producido un desplazamiento de TYLCSV por TYLCV, relacionado con el hecho de que TYLCV es transmitido de forma más eficiente por los biotipos locales de mosca blanca, además de la presencia de hospedantes alternativos para TYLCV que no lo son para TYLCSV, tales como la judía (Sánchez-Campos et al., 1999). También se ha relacionado este desplazamiento con la generalización del cultivo de variedades resistentes, que acumulan menores niveles de TYLCSV (Lacasa et al., 2001; García-Andrés et al., 2006, 2009).

La coinfección de plantas de tomate con TYLCSV y TYLCV dio lugar a la aparición de dos virus recombinantes, *Tomato yellow leaf curl Málaga Virus*

(TYLCMaV) (Monci et al., 2002) y *Tomato yellow leaf curl Axarquía virus* (TYLCAxV) (García-Andrés et al., 2006). Estos virus recombinantes tienen un rango de hospedantes más amplio que cualquiera de los progenitores. TYLCMaV está desplazando a TYLCV en las epidemias de la enfermedad en judía en el sur de España (Navas-Castillo et al., 1999; Monci et al., 2002; García-Andrés et al., 2007).

4.7. Métodos para el control de la enfermedad

Se han propuesto distintas alternativas para el control de la enfermedad. Algunas de ellas están basadas en el control del insecto vector. Como método de control de *B. tabaci* es muy frecuente la aplicación de insecticidas. Sin embargo, unido a los problemas medioambientales que esta medida conlleva, el uso repetido de pesticidas se ha traducido en el desarrollo de poblaciones de *B. tabaci* resistentes, siendo por tanto los tratamientos aplicados menos efectivos (Moriones y Navas-Castillo, 2000). Los métodos físicos, tales como el uso de mallas, presentan ciertas desventajas, como el sobrecalentamiento y el sombreado excesivo (Lapidot y Friedmann, 2002). También se han explorado las estrategias basadas en el empleo de enemigos naturales de los géneros *Eretmocerus* (Urbaneja et al., 2007) o *Encarsia* (Gerling et al., 2001). En cualquier caso, los métodos dirigidos a controlar el insecto vector resultan poco efectivos por sí solos, ya que son necesarios muy pocos insectos para que se produzca la transmisión de forma eficiente (Caciagli et al., 1995).

El análisis de las epidemias de TYLCV podría llevar a prácticas del manejo del cultivo que reducen la incidencia del virus. Por ejemplo, la existencia de un patrón estacional definido de epidemias podría ayudar a determinar los tiempos de trasplante más adecuados para evitar infecciones de TYLCV (Moriones y Navas-Castillo, 2010). Ya que los campos comerciales son la principal fuente de inicio de las epidemias de TYLCV, deberían llevarse a cabo convenientes rotaciones de cultivos en las grandes áreas, incluyendo períodos libres de cultivos hospedantes. Sin embargo, la eficacia puede ser reducida, ya que *B. tabaci* en sí puede ser un reservorio del virus en ausencia de una planta hospedante.

Estas prácticas tampoco resultan completamente eficientes, de forma que la mejor estrategia es el diseño de un manejo integrado que combine estas medidas con el cultivo de variedades resistentes.

4.8. Mejora genética para la resistencia

Durante los últimos años se han realizado considerables esfuerzos para desarrollar cultivares resistentes a TYLCD. Debido a la extrema susceptibilidad de la especie cultivada, la búsqueda de resistencia se ha centrado en las especies silvestres relacionadas.

Los trabajos de mejora de la resistencia a TYLCV comenzaron en 1974 con la utilización de la entrada LA121 de *Solanum pimpinellifolium*. Las líneas de mejora desarrolladas con LA121 exhibieron en condiciones de campo desarrollo moderado de síntomas de la enfermedad, sin embargo, el rendimiento y el crecimiento se mostraron marcadamente reducidos (Pilowsky y Cohen, 1990). Posteriormente, se emplearon otras entradas de esta especie, con niveles variables de resistencia. Kasrawi (1989) estudió la resistencia derivada de las entradas Hirsute-INRA y LA1478, habiendo identificado el gen dominante *Tylc* como responsable de la misma.

También se ha identificado resistencia en la entrada UPV 16991 de *S. pimpinellifolium*, si bien por tratarse de una resistencia de naturaleza recesiva, su utilidad se basa en aprovecharla combinada con otras fuentes con mayores niveles de resistencia (Pérez de Castro et al., 2007, 2008b).

Más recientemente, se ha descrito resistencia derivada de la entrada GI.1554 de esta misma especie; a partir del estudio de la población de RILs desarrollada por Viquez-Zamora et al. (2014) se han identificado dos QTLs responsables de la resistencia, uno en el cromosoma 11 y el otro en el cromosoma 3.

En cualquier caso, *S. pimpinellifolium* no ha sido la especie más explotada en la introgresión de resistencia a TYLCD en materiales comerciales. Los resultados de los primeros programas de mejora desarrollados con *S. pimpinellifolium* llevaron a la búsqueda de resistencia en otras especies silvestres. En concreto, el primer híbrido comercial, TY20, deriva de *S. peruvianum* PI 126935 (Pilowsky et al., 1989). Las hojas de plantas jóvenes de este híbrido infectadas con TYLCV presentaban una leve clorosis, pero los rendimientos eran aceptables (Pilowsky et al., 1989; Pilowsky y Cohen 1990). Estudios posteriores identificaron otras entradas de esta especie con distintos niveles de resistencia (Hassan et al., 1982; Hassan et al., 1987) y se desarrollaron distintas líneas de mejora, TY172 y TY197, con niveles elevados de resistencia (Lapidot et al., 1997; Friedmann et al., 1998). Tal y como se ha comentado previamente, la entrada PI 126944 de *S. peruvianum* ha sido descrita como resistente a TYLCD (Picó et al., 1998; Pilowsky

y Cohen 2000) y se ha comprobado que la resistencia se mantiene en materiales derivados a partir del cruce interespecífico de esta entrada con tomate cultivado (Picó et al., 2002; Pérez de Castro et al., 2008a; Julián et al., 2013).

S. chilense es otra de las especies en la que se han descrito las entradas con mayores niveles de resistencia. En concreto, la entrada LA1969, cuya resistencia es controlada por un gen mayor parcialmente dominante denominado *Ty-1* y dos genes modificadores (Zakay et al., 1991; Zamir et al., 1994), ha sido una de las más empleadas en los programas de mejora. Otras entradas de esta especie, LA1932, LA2779 y LA1938, mostraron elevados niveles de resistencia al begomovirus *Tomato mottle virus* (ToMoV) en programas de mejora de la Universidad de Florida, habiéndose comprobado posteriormente su resistencia a TYLCV (Scott y Schuster, 1991; Scott et al, 1996). Estas y otras entradas, tales como LA1960 y LA1971 han sido incorporadas a programas de mejora (Picó et al., 1999). Además, se ha comprobado que la resistencia derivada de las entradas LA1932, LA1960 y LA1971 tiene un control monogénico dominante, estando el gen responsable de la misma localizado en la región de los genes *Ty-1/Ty-3* (Pérez de Castro et al., 2013).

Se han identificado distintas fuentes de resistencia en la especie *S. habrochaites*, tales como LA386, LA1252, LA1295, LA1352, LA1393, LA1624 y LA1691 (Hassan et al., 1982). Entre las fuentes de mayor interés de esta especie destaca la entrada B6013 (Banerjee y Kalloo, 1987), a partir de la cual se desarrolló la línea H24 (Kalloo y Banerjee, 1990). Esta línea se identificó como portadora del gen de resistencia *Ty-2* (Hanson et al., 2006). La resistencia de *Ty-2* ha sido utilizada en programas de mejora de tomate en el Asian Vegetable Research and Development Center (AVRDC) y ha sido explotada por algunas casas de semillas para el desarrollo de híbridos. Sin embargo, esta fuente de resistencia no resulta efectiva frente a algunas de las especies causantes de TYLCD (Mejía et al., 2005), por lo que se han explorado otras resistencias derivadas de *S. habrochaites*. Vidavsky y Czosnek (1998), obtuvieron una serie de líneas resistentes y tolerantes resultantes del cruce entre LA1777 y LA386 de esta especie. La línea 902 resultó de particular interés, ya que impedía la acumulación del virus dando lugar a la ausencia de síntomas, incluso, tras ser inoculada con poblaciones masivas de mosca blanca, sin necesidad de protección con insecticidas. Esta línea fue utilizada para el desarrollo de híbridos, que constituyeron una importante fuente de resistencia en

programas de mejora en Oriente Medio (Maruthi et al., 2003) y Guatemala (Mejía et al., 2005).

También se ha identificado resistencia al vector *B. tabaci* en las especies *S. habrochaites* y *S. pennellii*, basada en mecanismos de antixenosis o antibiosis (Muniyappa et al., 1991; Channarayappa et al., 1992; Picó et al., 2001; Muigai et al., 2003). Sin embargo, estas fuentes no han sido explotadas debido al control genético complejo de la resistencia, además de al ligamiento de la misma con caracteres desfavorables desde el punto de vista agronómico (Lawson et al., 1997; Momotaz et al., 2005).

4.9. Mapeo de genes de resistencia

Desde el punto de vista de la mejora, la disponibilidad de marcadores moleculares ligados a los genes de resistencia resulta fundamental, tanto para la introgresión de los mismos mediante selección asistida por marcadores, como para la piramidalización de genes procedentes de distintas fuentes. Seis son los genes mayores que confieren resistencia a TYLCV que han sido mapeados y para los cuales se dispone por tanto de marcadores moleculares ligados: *Ty-1*, *Ty-2*, *Ty-3*, *Ty-4*, *ty-5* y *Ty-6*.

El gen *Ty-1* derivado de la entrada LA1969 de *S. chilense* fue inicialmente mapeado en el brazo corto del cromosoma 6, entre los marcadores RFLP TG297 y TG97 (Zamir et al., 1994). Posteriormente se desarrollaron marcadores basados en PCR, que permitieron localizar el gen en el brazo largo del cromosoma 6 (Pérez de Castro et al., 2007). Estudios recientes han permitido clonar el gen *Ty-1* habiéndose comprobado que codifica una ARN polimerasa dependiente de ARN (RDR), la cual podría estar involucrada en el silenciamiento génico transcripcional (Verlaan et al., 2011; Verlaan et al., 2013). El gen *Ty-3*, identificado en varias entradas de *S. chilense*, fue mapeado en el brazo largo del cromosoma 6, entre los marcadores cLEG-31-P-16 y T1079 (Ji et al., 2007). Posteriormente, el mapeo fino de *Ty-1* y *Ty-3* y su clonación ha confirmado la idea de que *Ty-1* y *Ty-3* son alelos del mismo gen (Verlaan et al., 2011, Verlaan et al., 2013).

El gen de resistencia presente en la línea H24 derivada de la accesión de B6013 de *S. habrochaites* se ha denominado *Ty-2* (Hanson et al., 2006). Este gen ha sido mapeado en la región terminal del brazo largo del cromosoma 11, aproximadamente a 5 cM de los marcadores TG105A y T0302 (Ji et al, 2009a).

La entrada LA1932 de *S. chilense* es portadora del gen *Ty-3*, además del gen *Ty-4*, con un efecto menor sobre la resistencia. Este gen ha sido mapeado en el brazo largo del cromosoma 3, entre los marcadores C2_At4g17300 y C2_At5g60160 (Ji et al., 2009b).

El gen *Ty-5* fue identificado inicialmente en la línea TY172, derivada de diferentes entradas de *S. peruvianum* (PI 126926, PI 126930, PI 390681 y LA0441) y ha sido mapeado en el cromosoma 4, cerca del marcador SINAC1 (Anbinder et al., 2009). Estudios posteriores identificaron este locus en el híbrido comercial “Tyking”, habiéndose sugerido que sea renombrado como *ty-5*, debido a la naturaleza recesiva del gen (Hutton et al., 2012). Además, estudios recientes sugieren que el origen de este gen de resistencia no se encuentra en *S. peruvianum*, sino en una mutación en la secuencia original de la especie cultivada (Levin et al., 2013). Se ha demostrado que *ty-5* codifica un homólogo del gen *pelota* (*Pelo*), implicado en la fase de reciclaje del ribosoma durante la síntesis de proteínas (Lapidot et al., 2015).

El locus *Ty-6*, derivado de la entrada LA2779 de *S. chilense* ha sido mapeado en el brazo largo del cromosoma 10 (Kadirvel et al., 2013; Hutton y Scott, 2014).

Bibliografía

- Abdel-Sahun AM (1990) Mechanical transmission of two Egyptian isolates of Beet curly top and *Tomato yellow leaf curl viruses*. Bulletin of Faculty of Agriculture, University of Cairo 41:825-842
- Abou-Jawdah Y, Maalouf R, Shebaro W, Soubra K (1999) Comparison of the reaction of tomato lines to infection by *Tomato yellow leaf curl begomovirus* in Lebanon. Plant Pathology 48:727-734
- Alpert KB, Tanksley SD (1996) High-resolution mapping and isolation of a yeast artificial chromosome contig containing *fw2.2*: a major fruit weight quantitative trait locus in tomato. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 93:15503-15507
- 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 119:519-53

Ashrafi H, Kinkade M, Foolad MR (2009) A new genetic linkage map of tomato based on a *Solanum lycopersicum* x *S. pimpinellifolium* RIL population displaying locations of candidate pathogen response genes. Genome 52:935-956

Bai Y, Lindhout P (2007) Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future. Annals of Botany 100:1085-1094

Bailey DW (1971) Recombinant inbred strains. Transplantation 11:325-327

Banerjee MK, Kalloo G (1987) Inheritance of *Tomato leaf curl virus* resistance in *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum*. Euphytica 36:581-584

Barbano PP, Topoleski LD (1984) Postfertilization hybrid seed failure in *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon peruvianum* ovules. Journal of the American Society for Horticultural Science 109:95-100

Barboza N, Blanco-Meneses M, Hallwass M, Moriones E, Inoue-Nagata A (2014) First Report of *Tomato yellow leaf curl virus* in Tomato in Costa Rica. Plant Disease 98: 699-699

Barrantes W, Fernández del Carmen A, López Casado G, González Sánchez MA, Fernández Muñoz R, Granell A y Monforte AJ (2014) Highly efficient genomics-assisted development of a library of introgression lines of *Solanum pimpinellifolium*. Molecular Breeding 34:1817–1831

Blanca J, Cañizares J, Cordero L, Pascual L, Díez MJ, Nuez F (2012) Variation revealed by SNP genotyping and morphology provides Insight into the origin of the tomato. PLoS ONE, 7:e48198

Blanca J, Montero-Pau J, Sauvage C, Bauchet G, Illa E, Díez MJ, Francis D, Causse M, van der Knaap E, Cañizares J (2015) Genomic variation in tomato, from wild ancestors to contemporary breeding accessions. BMC Genomics 16:257

Botermans M, Verhoeven JTJ, Jansen C, Roenhorst J, Stijger C, Pham K (2009) First report of *Tomato yellow leaf curl virus* in tomato in the Netherlands. Plant Disease 93:1073-1073

Briddon RW, Stanley J (2009) *Geminiviridae*. Encyclopedia of Life Sciences 1-12

- Brown JK, Frohlich DR, Rosell RC (1995). The sweet potato or silver leaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* (Genn.), or a species complex? Annual Review of Entomology 40:511-534
- Caciagli P, Bosco D, Al-Bitar L (1995) Relationships of the Sardinian isolate of *Tomato yellow leaf curl geminivirus* with its whitefly vector *Bemisia tabaci* Gen. European Journal of Plant Pathology 101:163-170
- Canady MA, Meglic V, Chetelat RT (2005) A library of *Solanum lycopersicoides* introgression lines in cultivated tomato. Genome 48:685-697
- Channarayappa C, Shivashankar G, Muniyappa V, Frist RH (1992) Resistance of *Lycopersicon* species to *Bemisia tabaci*, a tomato leaf curl virus vector. Canadian Journal of Botany 70:2184-2192
- Chen KY, Tanksley SD (2004) High-resolution mapping and functional analysis of *se2.1*: a major stigma exertion quantitative trait locus associated with the evolution from allogamy to autogamy in the genus *Lycopersicon*. Genetics 168:1563-1573
- Chetelat RT (2016) Overcoming sterility and unilateral incompatibility of *Solanum lycopersicum* × *S. sitiens* hybrids. Euphytica 207:319-330
- Chetelat RT, Meglic V (2000) Molecular mapping of chromosome segments introgressed from *Solanum lycopersicoides* into cultivated tomato (*Lycopersicon esculentum*). Theoretical and Applied Genetics 100:232-241
- Chetelat RT, Cisneros P, Stamova L, Rick CM (1997) A male-fertile *Lycopersicon esculentum* x *Solanum lycopersicoides* hybrid enables direct backcrossing to tomato at the diploid level. Euphytica 95:99-108
- Child A (1990) A synopsis of *Solanum* subgenus *Potatoe* (G. Don) (D'Arcy) [Tuberarium (Dun.) Bitter (s.l.)]. Feddes Reperit 101:209-235
- Cohen S, Antignus Y (1994) *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), a whitefly-borne geminivirus of tomatoes. Advances in Disease Vector Research 10:259-288
- Cohen S, Harpaz I (1964) Periodic, rather than continual acquisition of new tomato virus by its vector, the tobacco whitefly (*Bemisia tabaci* Gennadius) Entomologia Experimentalis et Applicata 7:155-166

- Cohen S, Nitzany FE (1966) Transmission and host range of the Tomato yellow leaf curl virus. *Phytopathology* 56:1127-1133
- Cohen J, Gera A, Ecker R, Ben-Joseph R, Perlman M, Gokkes M, Lachman O, Antignus Y (1995) Lisianthus leaf curl – a new disease of lisianthus caused by *Tomato yellow leaf curl virus*. *Plant Disease* 79:416-420
- Covey PA, Kondo K, Welch L, Frank E, Sianta S, Kumar A, Nuñez R, López-Casado G, van der Knaap E, Rose JKC, McClure BA (2010) Multiple features that distinguish unilateral incongruity and self-incompatibility in the tomato clade. *The Plant Journal* 64:367–378
- Credi R, Betti L, Canova A (1989) Association of a geminivirus with a severe disease of tomato in Sicily. *Phytopathologia Mediterranea* 28:223-226
- Czosnek H (2007) Interaction of *Tomato yellow leaf curl virus* with its whitefly vector. In: Czosnek H (Ed) *Tomato yellow leaf curl virus* disease: management, molecular biology, breeding for resistance. Springer, Berlin, pp. 157–170
- Dalmon A, Marchoux G (2000) *Tomato yellow leaf curl virus* host plants. *Phytoma* 527:14-17
- Davis J, Yu D, Evans W, Gokirmak T, Chetelat RT, Stotz HU (2009) Mapping of loci from *Solanum lycopersicoides* conferring resistance or susceptibility to *Botrytis cinerea* in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 119:305-314
- De Barro PJ, Liu SS, Boykin LM, Dinsdale A B (2011). *Bemisia tabaci*: a statement of species status. *Annual Review of Entomology* 56:1-19
- De Nettancourt D (2001) Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants. (Springer, Berlin)
- Díaz-Pendón JA, Cañizares MC, Moriones E, Bejarano ER, Czosnek H, Navas-Castillo, J (2010) Tomato yellow leaf curl viruses: Mènage à trois between the virus complex, the plant and the whitefly vector. *Molecular Plant Pathology* 11:441-450
- Díez MJ, Nuez F (2008) Tomato. In: Prohens J, Nuez F (Ed) *Vegetables II Handbook of Plant Breed* 2:249-323

- Doganlar S, Frary A, Ku HS, Tanksley SD (2002) Mapping quantitative trait loci in inbred backcross lines of *Lycopersicon pimpinellifolium* (LA1589). *Genome* 45:1189-1202
- Eshed Y, Zamir D (1995) An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTL. *Genetics* 141:1147-1162
- Fauquet CM, Bisaro DM, Briddon RW, Brown JK, Harrison BD, Rybicki EP, Stanley J (2003) Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family Geminiviridae, and an updated list of begomovirus species. *Archives of Virology* 148:405-421
- Font I, Martínez-Culebras P, Jordá C (2000) First report of Tomato yellow leaf curl virus-Is (TYLCV-Is) in the Canary Islands. *Plant Disease* 84:1046
- Font I, Martinez-Culebras P, Gomila J, Jorda C (2002) First report of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in the Balearic Islands. *Journal of Plant Pathology* 84:69
- Font MI, Córdoba C, García A, Santiago R, Jordá C (2005) First report of tobacco as a natural host of Tomato yellow leaf curl virus in Spain. *Plant Disease* 89:910
- Font MI, Rubio L, Martínez-Culebras PV, Jordá C (2007) Genetic structure and evolution of natural populations of viruses causing the Tomato yellow leaf curl disease in Spain. *Virus Research* 128:43-51
- Foolad MR (2007) Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International Journal of Plant Genomics* 1:52
- Francis DM, Kabelka E, Bell J, Franchino B, St. Clair D (2001) Resistance to bacterial canker in tomato (*Lycopersicon hirsutum* LA407) and its progeny derived from crosses to *L. esculentum*. *Plant Disease* 85:1171-1176
- Francki RIB, Fauquet C, Knudson DL, Brown F (1991) Classification and nomenclature of viruses; fifth report of the international committee on taxonomy of viruses. *Archives of Virology*, suppl 2
- Franklin-Tong VE, Franklin FC (2003) Gametophytic self-incompatibility inhibits pollen tube growth using different mechanisms. *Trends in Plant Science* 8:598-605

- 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* 123:1004-1007
- Fulton TM, Nelson JC, Tanksley SD (1997a) Introgression and DNA marker analysis of *Lycopersicon peruvianum*, a wild relative of the cultivated tomato, into *Lycopersicon esculentum*, followed through three successive backcross generations. *Theoretical and Applied Genetics* 95:895-902
- Fulton TM, Beckbunn T, Emmatty D, Eshed Y, Lopez J, Petiard V, Uhlig J, Zamir D y Tanksley SD (1997b) QTL analysis of an advanced backcross of *Lycopersicon peruvianum* to the cultivated tomato and comparisons with QTLs found in other wild species. *Theoretical and Applied Genetics* 95:881-894
- 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* 350:433-42
- García-Andrés S, Accotto GP, Navas-Castillo J, Moriones E (2007) Founder effect, plant host, and recombination shape the emergent population of begomoviruses that cause the tomato yellow leaf curl disease in the Mediterranean basin. *Virology* 359:302-12
- García-Andrés S, Tomas DM, Navas-Castillo J, Moriones E (2009) Resistance-driven selection of begomoviruses associated with the tomato yellow leaf curl disease. *Virus Research* 146:66-72
- Gerling D, Alomar O, Arno J (2001) Biological control of *Bemisia tabaci* using predators and parasitoids. *Crop Protection* 20:779-799
- 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* 91:188-196
- Gilbert JC (1958) Some linkage studies with the *Mi* gene for resistance to root-knot nematodes. *Report of the Tomato Genetics Cooperative* 8:15-17
- Gottlieb Y, Zchori-Fein E, Mozes-Daube N, Kontsedalov S, Skaljac M, Brumin M, Sobol I, Czosnek H, Vavre F, Fleury F, Ghanim M (2010) The transmission efficiency of *Tomato yellow leaf curl virus* by the whitefly *Bemisia tabaci* is correlated with the

- presence of a specific symbiotic bacterium species. *Journal of Virology* 84:9310-9317
- Grajera J (2006) Mejora de la calidad del tomate para industria. In: Mejora Genética de la Calidad en Plantas. Llácer G, Díez MJ, Carrillo JM, Badenes ML (Ed) SECH-UPV:299-332
- Gronenborn B (2007) The tomato yellow leaf curl virus: genome and function of its proteins. In: Czosnek H (Ed) Tomato yellow leaf curl virus disease: management, molecular biology and breeding for resistance. Springer, Dordrecht, pp. 67–84
- Hall TJ (1980) Resistance at the *Tm-2* locus in the tomato to *Tomato mosaic virus*. *Euphytica* 29:189-197
- Hanley-Bowdoin L, Settlege SB, Orozco BM, Nagar S, Robertson D (1999) Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18:71-106
- Hanson PM, Green SK, Kuo G (2006) *Ty-2*, a gene on chromosome 11 conditioning geminivirus resistance in tomato. *Report of the Tomato Genetics Cooperative* 56:17-18
- Harrison BD (1985) Advances in geminivirus research. *Annual Review of Phytopathology* 23:55-82
- Hassan AA, Mazyad HM, Moustafa SE, Nakhla MK (1982) Assessment of tomato yellow leaf curl virus resistance in the genus *Lycopersicon*. *Egyptian Journal of Horticulture* 9:13-116
- Hassan AA, Laterrot H, Mazyad HM, Moustafa SE, Nakhla MK (1987) Use of *Lycopersicon peruvianum* as a source of resistance to tomato yellow leaf curl virus. *Egyptian Journal of Horticulture* 14:173-176
- Hosseinzadeh MR, Shams-Bakhsh M, Osaloo SK, Brown JK (2014) Phylogenetic relationships, recombination analysis, and genetic variability among diverse variants of tomato yellow leaf curl virus in Iran and the Arabian Peninsula: Further support for a TYLCV center of diversity. *Archives of Virology* 159:485-497
- Hutton SF, Scott JW (2014) *Ty-6*, a major begomovirus resistance gene located on chromosome 10. *Report of the Tomato Genetics Cooperative* 64:14-18

- Hutton SF, Scott JW, Schuster DJ (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. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 47:324-327
- Imanishi S, Watanabe Y, Hiura I (1985) A simple and efficient method for the interspecific hybridization between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum*. *Journal of the Yamagata Agriculture and Forestry Society* 42:13-15
- Ji Y F, Schuster DJ, 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* 20:271-284
- Ji Y, Scott JW, Schuster DJ (2009a). Toward fine mapping of the *Tomato yellow leaf curl virus* resistance gene *Ty-2* on chromosome 11 of tomato. *Horticultural Science* 44:614-618
- Ji Y, Scott JW, Schuster DJ, Maxwell DP (2009b) Molecular mapping of *Ty-4*, a new *Tomato yellow leaf curl virus* resistance locus on chromosome 3 of Tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 134:281–288.
- Jordá C (1995) Virosis y micoplasmosis del tomate. In: Nuez F (Ed) *El Cultivo del Tomate*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, pp. 470-521
- Julián O, Herráiz J, Corella S, di Lolli I, Soler S, Díez MJ, Pérez de Castro A (2013) Initial development of a set of introgression lines from *Solanum peruvianum* PI 126944 into tomato: exploitation of resistance to viruses. *Euphytica* 193:183-196
- Kadirvel P, de la Peña R, Schafleitner R, Huang S, Geethanjali S, Kenyon L, Tsai W, Hanson P (2013) Mapping of QTLs in tomato line FLA456 associated with resistance to a virus causing tomato yellow leaf curl disease. *Euphytica* 190:297-308
- Kaloo G, Banerjee MK (1990) Transfer of *Tomato leaf curl virus* resistance from *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum* to *L. esculentum*. *Plant Breeding* 105:156-159
- Kao TH, Tsukamoto T (2004) The molecular and genetic bases of S-RNase-based self-incompatibility. *Plant Cell (Suppl.)* 16:S72–S83
- Kasrawi MA (1989) Inheritance of resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) in *Lycopersicon pimpinellifolium*. *Plant Disease* 73:435-437

- Kil EJ, Park J, Lee H, Kim J, Choi HS, Lee KY, Kim CS, Lee S (2014) *Lamium amplexicaule* (Lamiaceae): a weed reservoir for *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) in Korea. *Archives of Virology* 159:1305-1311
- Kil EJ, Kim S, Lee YJ, Byun HS, Park J, Seo H, Kim CS, Shim JK, Lee JH, Kim JK, Lee KY, Choi HS, Lee S (2016). *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV-IL): a seed-transmissible geminivirus in tomatoes. *Scientific Reports* 6:19013
- Kil EJ, Park J, Choi HS, Kim CS, Lee S (2017) Seed Transmission of *Tomato yellow leaf curl virus* in White Soybean (*Glycine max*). *The Plant Pathology Journal* 33:424-428
- Lacasa A, Alcázar A, Guerrero MM, Oncina M, Hita I, Martínez MC (2001) Aspectos epidemiológicos del *Tomato yellow leaf curl virus*. Influencia de una variedad tolerante sobre la incidencia de la virosis en otra sensible. *Agrícola Vergel* 233:268-276
- Lapidot M (2007) Screening for TYLCV-resistant plants using whitefly-mediated inoculation. In: Czosnek H (Ed) *Tomato yellow leaf curl disease. Management, molecular biology, breeding for resistance*. Springer, Dordrecht, pp. 329–342
- Lapidot M, Friedmann M (2002) Breeding for resistance to whitefly-transmitted geminiviruses. *Annals Applied Biology* 140:109-127
- Lapidot M, Friedmann M, Lachman O, Yehezkel A, Nahon S, Cohen S, Pilowsky M (1997) Comparison of resistance level to *Tomato yellow leaf curl virus* among commercial cultivars and breeding lines. *Plant Disease* 81:1425-1428
- 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:e1005538.
- Laterrot H (1978) Résistance aux maladies. B. *Pyrenochaeta lycopersici*. Rapport d'Activité INRA Station d'Ameloration des Plantes Maraicheres 102-103
- Laterrot H, Pecaut P (1969) Gene *Trn-2*: new source. *Report of the Tomato Genetics Cooperative* 19:13-14

- Lawson DM, Lunde CF Mutschler MA (1997) Marker-assisted transfer of acylsugars-mediated pest resistance from the wild tomato, *Lycopersicon pennellii*, to the cultivated tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Molecular Breeding* 3:307-317
- Lefeuvre P, Martin DP, Harkins G, Lemey P, Gray AJA, Meredith S, Lakay F, Monjane A, Lett JM, Varsani A (2010) The spread of *Tomato yellow leaf curl virus* from the Middle East to the world. *PLoS Pathogens* 6:e1001164
- Levin I, Karniel U, Fogel D, Reuveni M, Gelbart D, Evenor D, Chen L, Nahon S, Shlomo H, Machosh Z, Lapidot M (2013) Cloning and analysis of the *Tomato yellow leaf curl virus* resistance gene *ty-5*. 44th Tomato breeders round table meeting, Chiang Mai, Thailand
- Lewis D, Crowe L (1958) Unilateral interspecific incompatibility in flowering plants. *Heredity* 12:233-256
- Li J, Liu L, Bai Y, Zhang P, Finkers R, Du Y, Visser RGF, Van Heusden AW (2011) Seedling salt tolerance in tomato. *Euphytica* 178:403-414
- Linnaeus C (1753) *Species Plantarum*. 1st Ed Holmiae Stockholm
- Lippman ZB, Semel Y y Zamir D (2007) An integrated view of quantitative trait variation using tomato interspecific introgression lines. *Genetics & Development* 17:545-552
- Makkouk KM, Shehab S, Majdalani SE (1979) *Tomato yellow leaf curl*: incidence, yield losses and transmission in Lebanon. *Journal of Phytopathology* 96:263-26
- Martínez-Zubiaur Y, Fonseca D, Quiñones M, Palenzuela I (2004) Presence of *Tomato yellow leaf curl virus* infecting squash (*Cucurbita pepo*) in Cuba. *Plant Disease* 88:572
- Maruthi MN, Czosnek H, Vidavski F, Tarba SY, Milo J, Leviatov S, Venkatesh HM, Padmaja AS, Kukarni RS, Muniyappa V (2003) Comparison of resistance to *Tomato leaf curl virus* (India) and *Tomato yellow leaf curl virus* (Israel) among *Lycopersicon* wild species, breeding lines and hybrids. *European Journal of Plant Pathology* 109: 1–11
- McClure BA, Haring V, Ebert PR, Anderson MA, Simpson RJ, Sakiyama F, Clarke AE (1989) Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature* 342:955-957

- Mehta P, Wyman JA, Nakhla MK, Maxwell DP (1994) Transmission of Tomato yellow leaf curl geminivirus by *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Journal of Economic Entomology* 87:1291-1297
- Mejía L, Teni RE, Vidavsky F, Czosnek H, Lapidot M, Nakhla MK, Maxwell DP (2005) Evaluation of tomato germplasm and selection of breeding lines for resistance to begomoviruses in Guatemala. *Acta Horticulturae* 695:251-255
- Melzer M, Ogata D, Fukuda S, Shimabuku R, Borth W, Sether D, Hu J (2010) First report of *Tomato yellow leaf curl virus* in Hawaii. *Plant Disease* 94:641-641
- Miller P (1754) *The gardener's dictionary*. 4th Ed Lond John James Rivington
- Miller JC, Tanksley SD (1990) RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theoretical and Applied Genetics* 80:437-448
- Momotaz A, Scott JW, Schuster DJ (2005) Searching for silverleaf whitefly and begomovirus resistance genes from *Lycopersicon hirsutum* accession LA1777. *Acta Horticulturae* 695:117-12
- Monci F, Navas-Castillo J, Cenis JL, Lacasa A, Benazoun A, Moriones E (2000) Spread of *Tomato yellow leaf curl virus* Sar from the Mediterranean Basin: presence in the Canary Islands and Morocco. *Plant Disease* 84:490
- 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* 303:317-326
- Monforte AJ, Tanksley SD (2000) Development of a set of near isogenic and backcross recombinant inbred lines containing most of the *Lycopersicon hirsutum* genome in a *L. esculentum* genetic background: a tool for gene mapping and gene discovery. *Genome* 43:803-813
- Morilla G, Janssen S, García-Andrés S, Moriones E, Cuadrado IM, Bejarano ER (2005) Pepper (*Capsicum annuum*) is a dead-end host for *Tomato yellow leaf curl virus*. *Phytopathology* 95:1089-1097
- Moriones E, Arnó J, Accotto GP, Noris E, Cavallarin, L (1993) First report of *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* in Spain. *Plant Disease* 77:953

- Moriones E, Navas-Castillo J (2000) Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Research* 71:123-134
- Moriones E, Navas-Castillo J (2010) Tomato yellow leaf curl disease epidemics, In: Stansly PA, Naranjo E (Ed) *Bemisia: Bionomics and management of a global pest*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 259-282
- Muigai SG, Bassett MJ, Schuster DJ, Scott JW (2003) Greenhouse and field screening of wild *Lycopersicon* germplasm for resistance to the whitefly *Bemisia argentifolii*. *Phytoparasit* 31:27-38
- Muniyappa V, Jalikop SH, Saikia AK, Chennarayappa Shiva-shankar G, Ishwara Bhat A, Ramappa HK (1991) Reaction of *Lycopersicon* cultivars and wild accessions to *Tomato leaf curl virus*. *Euphytica* 56:37-41
- Navas-Castillo J, Sánchez-Campos S, Díaz JA, Sáez-Alonso E, Moriones E. (1997) First Report of *Tomato Yellow Leaf Curl Virus*-Is in Spain: Coexistence of Two Different Geminiviruses in the Same Epidemic Outbreak. *Plant Disease* 81:1461
- Navas-Castillo J, Sánchez-Campos S, Díaz JA, Sáez-Alonso E, Moriones E (1999) *Tomato yellow leaf curl virus*-Is causes a novel disease of common bean and severe epidemics in tomato in Spain. *Plant Disease* 83:29-32
- Ning W, Shi X, Liu B, Pan H, Wei W, Zeng Y, Sun X, Xie W, Wang S, Wu Q (2015) Transmission of *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* by *Bemisia tabaci* as affected by whitefly sex and biotype. *Scientific Reports* 5 10744:1-8
- Pan H, Chu D, Yan W, Su Q, Liu B, Wang S, Wu Q, Xie W, Jiao X, Li R (2012). Rapid spread of *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* in China is aided differentially by two invasive whiteflies. *PLoS One*, 7:e34817
- Paran I, Goldman I, Tanksley SD, Y Zamir D (1995) Recombinant inbred lines for genetic mapping in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 90:542-548
- Paterson RG, Scott SG, Gergerich RC (1989) Resistance in two *Lycopersicon* species to an Arkansas isolate of *Tomato spotted wilt virus*. *Euphytica* 43:173-178
- Peralta IE, Spooner DM (2000) Classification of wild tomatoes: a review. *Kurtziana* 28: 45-54

- Peralta IE, Spooner DM (2005) Relationships and morphological characterisation of wild tomatoes (*Solanum* L. Section *Lycopersicon* [Mill.] Wettst. Subsection *Lycopersicon*). Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden 104:227-257
- Peralta IE, Spooner DM, Knapp S (2008) The taxonomy of tomatoes: a revision of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*) and their outgroup relatives in sections *Juglandifolium* and *Lycopersicoides*. Systematic Botany Monographs 84:1-186
- Pérez de Castro AP, Blanca JM, Díez MJ, NuezVinals FN (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 117:347-356
- Pérez de Castro A, Herráiz J, Díez MJ, Soler S, Nuez F (2008a) Breeding program for the introgression of resistance to Tomato yellow leaf curl virus and Tomato spotted wilt virus derived from *Solanum peruvianum* PI126944 in tomato. XVI EUCARPIA Meeting Working Group Tomato, 12-15 de Mayo, Wageningen (Holanda) P1-03:51
- Pérez de Castro AP, Díez MJ, Nuez F (2008b) Exploiting partial resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* derived from *Solanum pimpinellifolium* UPV16991. Plant Disease 92:1083-1090
- Pérez de Castro A, Díez MJ, Nuez F (2011) Evaluation of a subset of *Solanum lycopersicoides* introgression lines for resistance to Tomato yellow leaf curl disease. XVII Eucarpia Meeting Group Tomato, Málaga
- Pérez de Castro AM, Vilanova S, Cañizares J, Pascual L, Blanca JM, Díez MJ, Prohens J, Picó B (2012) Application of genomic tools in plant breeding. Current Genomics 13:179-195
- Pérez de Castro A, Julián O, Díez M (2013) Genetic control and mapping of *Solanum chilense* LA1932, LA1960 and LA1971-derived resistance to tomato yellow leaf curl disease. Euphytica 190:203-214
- Pertuzé RA, Ji Y, Chetelat RT (2003) Transmission and recombination of homeologous *Solanum sitiens* chromosomes in tomato. Theoretical and Applied Genetics 107:1391-1401

- Picó B, Díez J, Nuez F (1996) Viral disease causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. *The Tomato yellow leaf curl virus*- a review. *Scientia Horticulturae* 67:151-196
- Picó B, Díez MJ, Nuez F (1998) Evaluation of whitefly-mediated inoculation techniques to screen *Lycopersicon esculentum* and wild relatives for resistance to *Tomato yellow leaf curl virus*. *Euphytica* 101:259-271
- Picó B, Ferriol M, Díez M, Nuez F (1999) Developing tomato breeding lines resistant to *Tomato yellow leaf curl virus*. *Plant Breeding* 118:537-542
- Picó B, Ferriol M, Díez MJ, Nuez F (2001) Agroinoculation methods to screen wild *Lycopersicon* for resistance to *Tomato yellow leaf curl virus*. *Journal of Plant Pathology* 83:215-220
- Picó B, Herráiz J, Ruíz JJ, Nuez F (2002) Widening the genetic basis of virus resistance in tomato. *Scientia Horticulturae* 94:73-89
- Pilowsky M, Cohen S (1990) Tolerance to *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* derived from *Lycopersicon peruvianum*. *Plant Disease* 72:248-250
- Pilowsky M, Cohen S (2000) Screening additional wild tomatoes for resistance to the whitefly-borne *Tomato yellow leaf curl virus*. *Acta Physiologiae Plantarum* 22:351-353
- Pilowsky M, Cohen S, Ben Joseph R, Shlomo A, Chen L, Nahon S, Krikun J (1989) Ty-20- a tomato cultivar tolerant to *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). *Hassadeh* 69:1212-1215
- Polston JE, Cohen L, Sherwood TA, Ben-Joseph R, Lapidot M (2006) *Capsicum* species: symptomless hosts and reservoirs of *Tomato yellow leaf curl virus*. *Phytopathology* 96:447-452
- Qiao H, Wang F, Zhao L, Zhou J, Lai Z, Zhang Y, Robbins TP, Xue Y (2004) The F-Box protein AhSLF-S2 controls the pollen function of S-RNase-based self-incompatibility. *Plant Cell* 16:2307-2322
- Quesada-Ocampo LM, Vargas AM, Naegele RP, Francis DM y Hausbeck MK (2016) Resistance to crown and root rot caused by *Phytophthora capsici* in a tomato

- advanced backcross of *Solanum habrochaites* and *Solanum lycopersicum*. *Plant Disease* 100:829-835
- Reina J, Jiménez J, Bejarano ER, Guerra JM, Cuadrado IM, García C (1994) El virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV). *Hortifruticultura* 6:36-40
- Reina J, Morilla G, Bejarano ER, Rodríguez MD, Janssen D, Cuadrado IM (1999) First report of *Capsicum annuum* plants infected by *Tomato yellow leaf curl virus*. *Plant Disease* 83:1176
- Rick CM (1979) Biosynthetic studies in *Lycopersicon* and closely related species of *Solanum*. In Hawkes JG, Lester RN, Skelding AD (Ed) *The biology and taxonomy of the solanaceae*. Academic Press, New York-London, pp. 667-668
- Rick CM (1987) Genetic resources in *Lycopersicon*. *Tomato Biotechnology*, Nevins DJ, Jones RA (Ed) Alan R Liss NY, USA, pp.17-26
- Rick CM, Butler L (1956) Cytogenetics of the tomato. *Advances in Genetics* 8:267-382
- Rojas MR, Hagen C, Lucas WJ, Gilbertson RL (2005) Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology* 43:361-394
- Ronen G, Carmel-Goren L, Zamir D, Hirschberg J (2000) An alternative pathway to betacarotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of beta and oldgold color mutations in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:11102-11107
- Rosell RC, Torres-Jerez I, Brown JK (1999) Tracing the geminivirus-whitefly transmission pathway by polymerase chain reaction in whitefly extracts, saliva, hemolymph and honeydew. *Phytopathology* 89:239-246
- Roselló S, Nuez F (2006) Mejora de la calidad del tomate para fresco. In: *Mejora Genética de la Calidas en Plantas*. Llácer G, Díez MJ, Carrillo JM, Badenes ML (Ed) SECH-UPV:333-359
- Rowe RC, Farley JD (1981) Strategies for controlling *Fusarium* crown and root rot in greenhouse tomatoes. *Plant Disease* 65:107-112

- Roye ME, Wernecke ME, McLaughlin WA, Nakhla MK, Maxwell DP (1999) *Tomato dwarf leaf curl virus*, a new bipartite geminivirus associated with tomatoes and peppers in Jamaica and mixed infection with *Tomato yellow leaf curl virus*. *Plant Pathology* 48:370-378
- Rubinstein G, Czosnek H (1997). Long-term association of *Tomato yellow leaf curl virus* with its whitefly vector *Bemisia tabaci*: effect on the insect transmission capacity, longevity and fecundity. *Journal of General Virology* 78:2683-2689
- Salati R, Nakhla MK, Rojas MR, Guzmán P, Jaquez J, Maxwell DP, Gilbertson RL (2002) Tomato yellow leaf curl virus in the Dominican Republic: characterization of an infectious clone, virus monitoring in whiteflies, and identification of reservoir hosts. *Phytopathology* 92:487-496
- Sánchez-Campos S, Navas-Castillo J, Camero R, Soria C, Díaz JA, Moriones E (1999) Displacement of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV)-Sr by TYLCV-Is in tomato epidemics in Spain. *Phytopathology* 89:1038-1043
- Sánchez-Campos S, Navas-Castillo J, Monci F, Díaz JA, Moriones E (2000) *Mercurialis ambigua* and *Solanum luteum*: two newly discovered natural hosts of *Tomato yellow leaf curl geminiviruses*. *European Journal of Plant Pathology* 106:391-394
- Scott JW, Schuster DJ (1991) Screening of accessions for resistance to the Florida tomato geminivirus. *Report of the Tomato Genetics Cooperative* 41:48-50
- Scott JW, Stevens MR, Barten JHM, Thome CR, Polston JE, Schuster DJ, Serra CA (1996) Introgression of resistance to whitefly-transmitted geminiviruses from *Lycopersicon chilense* to tomato. In: Gerling D, Mayer RT (Ed) *Bemisia: Taxonomy, biology, damage control, and management*. Intercept, Andover, UK, pp. 357-367
- Sijacic P, Wang X, Skirpan AL, Wang Y, Dowd PE, McCubbin AG, Huang S, Kao TH (2004) Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature* 429:302-305
- Smith PG (1944) Embryo culture of a tomato species hybrid. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 44:413-416
- Soler S, Belmonte I, Aramburu J, Galipienso L, López C, Sifres A, Pérez de Castro A, Díez MJ (2012) Identificación de una fuente de tolerancia al ToMV en una colección

- de líneas de introgresión derivada de *Solanum lycopersicoides* LA2951. XVI Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología, Málaga
- Soler S, Nuez F (2004) Genes de Resistencia en cultivos hortícolas. Resistencia genética a patógenos vegetales. Editorial de la UPV:393-463
- Tanksley SD, Nelson JC (1996) Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines. *Theoretical Applied Genetics* 92:191-203
- Tournefort JP (1694) *Elemens de Botanique*. Paris: l'Imprimerie royale.
- Tovar-Méndez A, Lu L, McClure B (2017) HT proteins contribute to S-RNase-independent pollen rejection in *Solanum*. *The Plant Journal* 89:718-729
- Urbaneja A, Sánchez E, Stansly PA (2007) Life history of *Eretmocerus mundus*, a parasitoid of *Bemisia tabaci*, on tomato and sweet pepper. *BioControl* 52:25-39
- Van Brunshot S, Persley D, Geering A, Campbell P, Thomas J (2010) *Tomato yellow leaf curl virus* in Australia: distribution, detection and discovery of naturally occurring defective DNA molecules. *Australasian Plant Pathology* 39:412-423
- Verlaan MG, Szinay D, Hutton SF, De Jong H, Kormelink R, Visser RGF, Scott JW, Bai Y (2011) Chromosomal rearrangements between tomato and *Solanum chilense* hamper mapping and breeding of the TYLCV resistance gene *Ty-1*. *The Plant Journal* 68:1093-1103
- Verlaan MG, Hutton SF, Ibrahim RM, Kormelink R, Visser RG, Scott JW, Edwards JD y 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:e1003399
- Vidavsky F, Czosnek, H (1998) Tomato breeding lines immune and tolerant to *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) issued from *Lycopersicon hirsutum*. *Phytopathology* 88:910-914
- Viquez-Zamora M, Caro M, Finkers R, Tikunov Y, Bovy A, Visser RG, Bai Y, van Heusden S (2014) Mapping in the era of sequencing: high density genotyping and its application for mapping TYLCV resistance in *Solanum pimpinellifolium*. *BMC Genomics* 15:1152

- Wehrhahn C, Allard W (1965) The detection and measurement of the effects of individual genes involved in the inheritance of a quantitative character in wheat. *Genetics* 51:109-119
- Wu J, Dai F, Zhou X (2006) First report of *Tomato yellow leaf curl virus* in China. *Plant Disease* 90:1359
- Yamakawa K, Nagata N (1975) Three tomato lines obtained by use of chronic gamma radiation with combined resistance to TMV and *Fusarium* race J-3. *Technical News, Institute of Radiation Breeding* 16:2-95
- Zakay Y, Navot N, Zeidan M, Kedar N, Rabinowitch H, Czosnek H, Zamir D (1991) Screening *Lycopersicon* accessions for resistance to *Tomato yellow leaf curl virus*: presence of viral DNA and symptoms development. *Plant Disease* 75:279-281
- Zamir D (2001) Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nature Reviews Genetics* 2:983-989
- Zamir D, Michelson I, Zakay Y, Navot N, Zeidan M, Sarfatti M, Eshed Y, Harel E, Pleban E, van-Oss T, Kedar N, Rabinowitch HD, Czosnek H (1994) Mapping and introgression of a Tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, *Ty-1*. *Theoretical and Applied Genetics* 88:141-146
- Zong YY, Liu L, Li T, Sayed-Rashid AS, Zhou LX, Sun YY, Zhenng Z, Zheng QG, Li JM (2012) Mapping of QTLs conferring the resistance to *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* (TYLCV) in *Solanum lycopersicoides*. *Acta Horticulturae Sinica* 39:915-922

OBJETIVOS

Uno de los factores que limita la producción de tomate a nivel mundial es la susceptibilidad de este cultivo frente a numerosos patógenos. Entre ellos, los virus son de especial importancia, al no existir tratamientos curativos. Una de las enfermedades que ha ocasionado epidemias devastadoras es la enfermedad del rizado amarillo del tomate, TYLCD, causada por un complejo de especies virales pertenecientes al género *Begomovirus* de la familia Geminiviridae. Dada la extrema susceptibilidad del tomate frente a este virus, la mejora genética se ha orientado hacia la explotación de la resistencia identificada en las especies silvestres emparentadas con el tomate. En este sentido, en trabajos anteriores del grupo de investigación, se identificó resistencia en la entrada PI 126944 perteneciente a la especie *Solanum peruvianum*. El elevado grado de incompatibilidad de esta especie con el tomate cultivado dificultó la obtención de los primeros híbridos interespecíficos, siendo necesario aplicar distintas técnicas, como el rescate de embriones y semillas inmaduras. La obtención de las generaciones subsiguientes fue igualmente dificultosa, por lo que se hizo necesario investigar en esta línea a fin de determinar los factores limitantes de su obtención y desarrollar un protocolo más eficiente.

Numerosos grupos de investigación han trabajado en el desarrollo de variedades resistentes a TYLCD. Aunque se conocen diversos genes, que en estos momentos están siendo utilizados a escala comercial en los híbridos desarrollados por las empresas, el problema no está resuelto y sigue siendo necesario explorar nuevas resistencias. Sin embargo, el cribado de los materiales por su resistencia presenta dificultades, variando el desarrollo de los síntomas en función de los factores ambientales en los que se realiza cada ensayo. Con el propósito de solventar esta dificultad, Lapidot et al (2006) desarrollaron una escala de materiales con distinto grado de resistencia para utilizarla en los ensayos de cribado. La comparación de los materiales en estudio con esta escala de referencia facilita la evaluación precisa del nivel de resistencia de cada planta, en particular en materiales de generaciones segregantes. Sin embargo, antes de la utilización de esta escala es necesario comprobar su consistencia en diferentes ambientes, para poder interpretar con precisión los resultados obtenidos.

En este contexto, los objetivos de esta tesis son:

- 1) Desarrollar un protocolo optimizado para la obtención de generaciones avanzadas de retrocruzamiento entre materiales derivados de *S. peruvianum* y el tomate cultivado.
- 2) Continuar con la obtención de descendientes de generaciones más avanzadas a partir de las disponibles
- 3) Estudiar el comportamiento de la escala desarrollada por Lapidot et al (2006) en varias condiciones, con objeto de determinar su consistencia frente a estos factores y determinar su utilización en ensayos de cribado.

Obtaining advanced generations from *Solanum peruvianum* PI 126944 in the genetic background of *S. lycopersicum* by immature seed culture

G. Campos, C. Gisbert, A. Pérez-de-Castro, M. J. Díez

Euphytica (2017) 213:63

ABSTRACT

The accession *Solanum peruvianum* PI 126944 has been reported as resistant to different biotic and abiotic stresses. In previous works of the group, advanced generations were derived from two interspecific hybrids, including up to pseudo-F₆ generations and backcrosses to the cultivated species of some of the pseudo-F_n generations. Moreover, resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) and *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) was confirmed in some of the plant materials obtained. Here we describe the development of some advanced backcross generations between the cultivated tomato and *S. peruvianum*. Three backcross assays were carried out. In the first assay, 16 plants belonging to pseudo-F₄, pseudo-F₅ and pseudo-F₆ generations were backcrossed as male parents to cultivated tomato. Immature seeds from the 408 fruits obtained were platted and 77 plants were regenerated. A total of 21 descendants obtained in the first assay were back- crossed as male parents in the second assay, which allowed the obtaining of 599 fruits and regeneration of 365 plants. The 19 male parents used in the third assay were obtained either in the first or in the second one. Seventeen of them were obtained in the first assay and two in the second. A total of 339 plants were regenerated from 519 fruits. A high number of the plants obtained in these assays has been acclimated. Some plants set fruits with viable seeds.

Keywords: Cultivated tomato · In vitro culture · Incompatibility · Introgression lines

INTRODUCTION

Many years of domestication have reduced the levels of variation of modern cultivars (Bai and Lindhout 2007). Therefore, tomato breeding has focused for decades on the use of wild relatives, mainly the 12-species belonging to the ‘tomato clade’ (*Solanum* section *Lycopersicon*). These species represent a source of genetic variability due to its wide range of adaptation to biotic and abiotic stresses, especially the self-incompatible species like *Solanum chilense* and *S. peruvianum* (Rick 1988). Crosses are possible between cultivated tomato and all species of section *Lycopersicon*, but differences in crossability exist, depending on the species and the accession considered (Stevens and Rick, 1986). *S. peruvianum* sensu lato (s.l.) is the most distant wild tomato relative included in the section *Lycopersicon* (Peralta et al., 2008). This species is considered the most variable. In fact, it has been reclassified in four separate species: *S. peruvianum* sensu stricto (s.s.), *S. corneliomuelleri*, *S. huaylasense*, and *S. arcanum*. Hereinafter *S. peruvianum* s. l. will be referred as *S. peruvianum*. Several accessions of *S. peruvianum* have been identified as resistant to pests, diseases and abiotic stresses, making them a source of new genes for breeding. However, its use has been limited due to incompatibility barriers and fertility problems of the progenies obtained (Rick 1986). Hybrids between *S. lycopersicum* and *S. peruvianum* can only be obtained when the cultivated species is used as female parent, as unilateral incompatibility exists (Hogenboom 1972; Rick et al., 1986). For some accessions, the cross *S. lycopersicum* x *S. peruvianum* produces viable progenies, although the number of hybrid seeds per fruit is very low (e.g., Rick 1983; Fulton et al., 1997). In any case, in most of the crosses, the hybrid embryos abort in early stage due to endosperm deterioration. Differences have been found regarding the time course of hybrids embryo development. The first interspecific hybrid between cultivated tomato and *S. peruvianum* was obtained with accession PI 128657, in order to transfer the root-knot nematode resistance gene *Mi* to the cultivated species (Smith 1944). The author described degeneration of the embryo 30–40 days after pollination. Also working with *S. peruvianum* interspecific hybrids Barbano and Topoleski (1984) reported that embryos had degenerated completely 17 days after pollination. In a study conducted later with three different accessions of *S. peruvianum*, a retarded development of hybrids embryos was observed, and degeneration of the endosperm occurred about nine days after pollination (Chen and Adachi 1992). Discrepancies may be due to the use of different accessions of *S. peruvianum* (Chen and

Adachi 1992). The incompatibility also affects when trying to backcross the F₁ to tomato (Chen y Adachi 1995). Therefore, tissue culture techniques, such as embryo rescue or immature seeds culture, are usually required to obtain the interspecific hybrid and subsequent generations (Rick 1986). Even with the use of tissue culture, few progenies is obtained from these crosses. Several attempts have been reported, which tried to optimize the method to overcome the cross- ability barriers (e.g., Segeren et al., 1993; Doganlar et al., 1997; Pratta et al., 1999; Silva da Costa Ribeiro and de Britto Giordano 2001; Picó et al., 2002; Kharkongar et al., 2013). The factors most frequently studied were the culture media, the date of fruit collection after pollination and the cultivation of seeds with a cut in the chalazal region. In any case, there is not an efficient method available to routinely obtain progeny from crosses between the cultivated tomato and *S. peruvianum*. Thus, there is the need to adapt the protocols available to the accession and to the conditions of each assay.

The accession *S. peruvianum* PI 126944 has been reported as resistant to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) (Paterson et al. 1989), *Tobacco mosaic virus* (TMV) (Yamakawa and Nagata 1975), *Tomato leaf curl virus* (ToLCV) (Muniyappa et al. 1991), *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (Picó et al., 1998; Pilowsky and Cohen 2000) and to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Rowe and Farley 1981). Some interspecific hybrids between this accession and the cultivated tomato were obtained by immature seed culture in previous works (Picó et al., 2002). These F₁ plants resulted resistant to TSWV and TYLCV. Subsequent generations were later derived from two of the interspecific hybrids with the objective to initiate the construction of a set of introgression lines (Julián et al., 2013). A limited number of plants were obtained by embryo rescue corresponding to three backcross generations to tomato. Due to self-incompatibility, crosses between the F₁ plants were made to obtain pseudo-F₂ generations, with the same procedure up to the pseudo-F₆ generations. Additional crosses were carried out, including backcrosses of some plants, followed by embryo rescue, and crosses between plants of different generations. Resistance to TYLCV and TSWV was confirmed in some of these generations (Julián et al., 2013).

With the last goal to obtain introgression lines from PI 126944, the aim of this work is to use the derived materials and advance in the achievement of backcrosses to tomato. In this work, we study several factors in order to optimize the procedure and face

with incompatibility problems. Backcrosses to *S. lycopersicum* of different *S. peruvianum* PI 126944-derived materials were conducted and a lot of progenies were obtained.

MATERIALS AND METHODS

Three assays were carried out; the first one was conducted in spring-summer 2013, the second in spring-summer 2014, and the third one in autumn 2014.

Plant material

In a previous work, the cultivated tomato variety NE-1 was crossed as female parent to *S. peruvianum* PI 126944 obtaining three interspecific hybrids (Picó et al., 2002). Due to their self-incompatibility, subsequent generations were obtained by crossing two of them, obtaining a pseudo-F₂ generation. The same procedure was followed to obtain pseudo-F₃ until pseudo-F₆ generations (Julián et al., 2013). Some of those plants and their progeny were used as male parents in the three assays here described (Table 1). In the first assay (spring 2013) three pseudo-F₄, six pseudo-F₅ and seven pseudo-F₆ plants were crossed as male parents to the old cultivated tomato variety Fortuna C (FC) and to the breeding line NE-1. In the second assay (spring 2014) four pseudo-F₄BC₁, 13 pseudo-F₅BC₁ and four pseudo-F₆BC₁ plants, derived from the first assay, were backcrossed to the tomato variety FC. In the third assay (autumn 2014), three pseudo-F₄BC₁, nine pseudo-F₅BC₁ and five pseudo-F₆BC₁ plants obtained in the first assay were back-crossed to the tomato variety FC. Additionally, two plants of the pseudo-F₅BC₂ generation obtained in the second assay were crossed to FC. The old variety FC holds the recessive gene *c* which determines the potato leaf phenotype. It was used to detect erroneous emasculations that lead to selfing instead of true crosses in the first backcross. Male parents differed in the time and abundance of flowering, conditioning the number of crosses made with each of them. One day before anthesis when the petals changed from green- yellow to yellow, flowers of FC plants were emasculated. Hand-pollination was performed one day later to allow the complete maturation of the pistil. As crosses were performed in an insect-proof glasshouse it was not necessary to isolate the flowers after pollination. Fruits obtained were collected at different dates after pollination (Table 1).

Immature seeds rescue

First assay

Fruits were harvested at 21, 25, 30 and 35 days after pollination (dap). All immature seeds were extracted from the fruits in aseptic conditions, removing the mucilage by rubbing on sterile filter paper. Clean seeds were cultured in Petri dishes. Three different media were used: M1 (4.414 g/L Murashige & Skoog Medium (MS) (Murashige and Skoog 1962) + Gamborg Vitamins B5, 30 g/L sucrose, 1 g/L yeast extract, 0.8% agar, 2 mg/L 2,4-dicholophenoxyacetic acid, 1 mg/L 6-benzilaminopurine, pH adjusted to 5.7), M2 (4.414 g/L Murashige & Skoog Medium (MS) + Gamborg Vitamins B5, 30 g/L sucrose, 0.2 mg/L zeatin, 0.8% agar, pH adjusted to 5.7) and M3 (4.414 g/L Murashige & Skoog Medium (MS) + Gamborg Vitamins B5, 30 g/L sucrose, 0.5 mg/L zeatin, 0.2 mg/L indolacetic acid, 0.8% agar, pH adjusted to 5.7). The platted seeds were kept in a climatic chamber at 24–26 °C with fluorescent light (50 $\mu\text{mol photons/m}^2\text{s}$) for 16 h per day, remaining the 7 first days in the dark. Seeds and developed calli were subcultured to fresh medium monthly. Monitoring was performed every two weeks for three months.

Table 1 Parents involved in the backcrosses performed, culture media, days after pollination and treatment of seeds for the three assays

Assay	Female parent	Generation of male parents	Culture media	Days after pollination	Selection of platted seed ^a	Cut/entire seeds
First	'FC' and 'NE-1'	Pseudo-F4 (3)				
	'FC' and 'NE-1'	Pseudo-F5 (6)	M1-M2-M3	21-25-30-35	No	Entire
Second	'FC'	Pseudo-F6 (7)				
		Pseudo-F4BC1 (4) Pseudo-F5BC1 (13)	M2	25-30-35	Yes	Entire/ occasionally cut
Third	'FC'	Pseudo-F6BC1 (4)				
		Pseudo-F4BC1 (3) Pseudo-F5BC1 (9)	M2	25-30-35	Yes	Half entire and half cut
		Pseudo-F6BC1 (5) Pseudo-F5BC2 (2)				

^a Seeds with extremely scarce development were discarded

Direct germination, calli formation and shoot from developed calli were noted. Shoots were isolate and transferred for rooting to Baby jars pots containing a basal medium (4.414 g/L Murashige & Skoog Medium (MS) + Gamborg Vitamins B5, 20 g/L

sucrose, 0.8% agar, pH adjusted to 5.7). Rooted plants were transferred to small pots and covered with a plastic cup to avoid dehydration. Plants were placed in a growth chamber at 24–26 °C with fluorescent light (50 $\mu\text{mol photons/m}^2\text{s}$) for 16 h per day. When plants showed shoot elongation, they were transferred to a greenhouse.

Second assay

According to the results obtained in the first assay some variations were made in the protocol used in 2013 (Table 1). Briefly, fruits were collected at 25, 30 and 35 days after pollination, seeds with extremely scarce development were not rescued from fruits, and finally only the M2 medium was employed. Seeds with extremely scarce development were smaller than the other immature seeds with less than 1 mm in diameter and semi-transparent. Some of the rescued seeds were cut to see the developmental stage of the embryo and to check the effect of cutting the seeds on the regeneration of plants.

Third assay

Conditions used in this assay were basically the ones described for the second assay (Table 1). The only difference was that half of the seeds were cultured closed and the other half after making a small cut in the chalazal region, in order to facilitate contact of the embryo with the culture medium. This cut was performed by holding the seed with the help of a needle and puncturing the testa carefully.

Calculation of efficiency

The efficiency of the technique was calculated as the number of plants regenerated in vitro by fruit and by number of seeds cultured.

The significance of the different factors assayed was calculated by ANOVA. Mean values were compared using Fisher LSD at $P = 0.05$.

RESULTS

First assay: obtaining of the FnBC₁ generation

Sixteen plants of different generations derived from a cross between *S. lycopersicum* and *S. peruvianum* PI 126944 were backcrossed to *S. lycopersicum* (Table 1). The old variety FC and the breeding line NE-1 were used as female parents. There

was not significant effect of the female parent on the number of seeds per fruit and plants obtained. For this reason, results with both female parents were analyzed together.

A total of 408 fruits were obtained from 10 different male parents (Table 2). Despite the experiment was initiated with 16 male parents only 10 flowered enough during the period in which hand pollinations were made. The other six took part only in a few crosses, obtaining less than five fruits per parent that did not lead to the regeneration of any plant. The number of seeds per fruit ranged from 22.89 to 39.33 with a total of 12,349 immature seeds dissected and plated. Seeds were small and white to pale green coloured. Some of them were opened to check for embryo development. In many cases seeds were apparently empty, indicating that the abortion of the embryo had already probably occurred. Others contained globular embryos. Only occasionally embryos in heart or torpedo stage were observed. Regardless of the presence or apparent absence of embryos all seeds were cultured. Seeds from each fruit were equally divided and cultured in each of the three tested culture media.

Many seeds eventually turned dark and became nonviable; this was especially frequent for seeds cultured in M1. Seeds very small and poorly developed never progressed neither to callus formation nor by germination. Callus formation was observed in a low percentage of seeds. Some of these calli turned black or discolored within three weeks, while others stayed green and produced shoots. Besides, some embryos germinated directly without a previous phase of callus. The predominant response was the regeneration of shoots after a callus phase (62%). In some cases degeneration occurred after the initiation of root and shoot growth. Even after three months, it was possible to observe occasionally the development of new callus.

Table 2 Number of fruits, plated seeds and plants regenerated in the First assay

Generation	Parent	Number of fruits	No. plated seeds	No. of plants coming from direct germination				No. of plants developed from calli				Total number of plants	No. plants/ N8 fruits	No. plants/ plated seeds
				Culture media			Subtotal	Culture media			Subtotal			
				1	2	3		1	2	3				
pseudo-F ₄	34 PI-1	142	4251	0	6	3	9	0	7	4	11	20	0.14	0.005
pseudo-F ₅	2	28	747	0	1	5	6	0	5	4	9	15	0.54	0.020
	5	61	2343	0	5	1	6	0	7	3	10	16	0.26	0.007
	8	26	867	0	0	0	0	0	1	3	4	4	0.15	0.005
	11	40	1126	0	1	1	2	0	1	1	2	4	0.10	0.004
	15	19	435	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0.05	0.002
	17	33	957	0	2	1	3	0	3	1	4	7	0.21	0.007
pseudo-F ₆	160 PI-2	14	322	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0.07	0.003
	162 PI-3	12	472	0	1	0	1	0	0	3	3	4	0.33	0.008
	179 PI-2	33	829	0	1	0	1	0	4	0	4	5	0.15	0.006
	Total/Mean	408	12349	0	18	11	29	0	29	19	48	77	0.19	0.006

No plants were obtained from seeds cultured in M1. In both media M2 and M3 regeneration of shoots (direct or indirectly) was observed in 100 and 70% of crosses, respectively. The number of plants regenerated previous callus formation was higher in both media. There was not a significant effect of the culture media 2 and 3 on the number of plants obtained per fruit ($P = 0.1778$). Thus, the M2 was selected for future assays, because of its lower complexity and cost with respect to M3. Seventy-seven plants pseudo-BC₁ from several pseudo-F_n generations were obtained in this assay. The efficiency of each cross measured as the number of plants obtained per fruit varied among the different male parents, ranging from 0.05 to 0.54 (Table 2). The efficiency of the technique also varied according to the days after pollination. The best results were obtained from fruits collected 35 dap, decreasing for fruits collected at 30 an even more at 25 and 21 dap (Table 3).

Forty-six out of the 77 plants obtained were successfully acclimatized and reached fully development in the greenhouse. The rest of plants developed an abnormal growth in vitro or died by contamination. The appearance of the plants was more similar to *S. peruvianum* than to tomato, as expected for the first backcross to tomato. Stems, leaves and inflorescences had short hairs, inflorescences contained many flowers, and the styles were predominately exerted, although less than those of *S. peruvianum* (Fig. 1). Fruit set was checked periodically. Most plants did not set fruits, which demonstrated that the self-incompatibility still persisted in this generation. A few plants developed small and green pseudo-fruits but they did not produce any seed. Eleven plants set some fruits producing

between 1 and 10 seeds similar in size and appearance to those of *S. peruvianum*. Only two plants produced up to 20 seeds.

Second assay: obtaining of the F_nBC₂ generation

According to the results obtained in the previous assay some modifications were performed in the methodology: the culture M2 was used in this assay and no fruits were collected at 21 days after pollination.

Twenty-one plants obtained in the first assay were used as male parents and backcrossed to FC. A total of 599 fruits were obtained and 8536 seeds were platted (Table 4). Some seeds randomly chosen were opened to check if they contained normal embryos. Globular and heart embryos were found in some of the seeds coming from fruits collected at 25 and 30 dap. Only in fruits of 35 dap embryos in cotyledonary stage were occasionally observed. Up to 37% of these open seeds produced a plant, a high proportion compared to the 3.5% of closed seeds that developed to an entire plant.

Table 3 Efficiency obtained depending on the days from pollination to fruit harvest

Days after pollination ^a	Number of fruits	Number of seeds	Number of plants	N° plants/N° fruits
First assay				
21	181	5237	21	0.12
25	84	2706	11	0.13
30	85	2685	16	0.19
35	71	1959	22	0.32
Second assay				
25	194	3856	152	0.78
30	194	2549	124	0.64
35	211	2131	80	0.38
Third assay F _n BC ₂				
25	147	1807	76	0.52
30	157	1466	81	0.52
35	181	1515	60	0.33
Third assay F _n BC ₃				
25	12	169	57	4.75
30	13	135	27	2.08
35	13	150	37	2.85

^a Days from pollination to fruit harvest

Plants were obtained either by embryo germination or by formation of a callus. Calli not always progressed until the development of a shoot and a subsequent plant; instead some of them stopped its growth and turned dark. A total of 356 plants pseudo-BC₂ were obtained in this assay, 206 of them by direct germination and 150 after the

development of a callus. According to these results, direct germination was the predominant way of development.

The number of plants per fruit differed per male parent between 0 and 1.17. In any case, the efficiency in this second assay was higher than the one obtained in the first assay. Regarding the number of days after pollination, the number of fruits harvested in each data was similar but the number of seeds plated was very different (Table 3). The highest number of seeds plated was from fruits collected at 25 dap, followed by the ones collected at 30 dap and finally to the ones collected at 35 dap. As described in Materials and methods, not all seeds were plated, discarding those very small and poorly developed. Comparatively, in a fruit collected at 25 days after pollination all seeds are more similar in size and appearance and a higher number of seeds were placed in the Petri dishes compared to the seeds coming from fruits harvested at 35 days in which differences in growth and size between seeds were maximized. The higher efficiency measured as the number of plants per fruit was for fruits harvested at 25 dap.

One hundred and thirty-three plants out of the 360 plants obtained in this second assay were acclimatized and transplanted in a greenhouse to check their phenotypic appearance and fertility. A high proportion was sterile, exhibited an abnormal growth giving dwarf plants that did not produce any inflorescence. Others developed normally and gave inflorescences but no fruit set because of alternatively self-incompatibility or male-sterility. These types of plants were found regardless of male parent. Both, normal and abnormal flowers were produced by these plants. Abnormal flowers had significant difference on morphology of organs (pistils, anthers and petals) with very abnormal development (Fig. 2). Still 21 plants had a normal vegetative and reproductive behaviour, setting fruits with apparently normal seeds. These plants differed in their vegetative characteristics, vigour, inflorescences, flowers and, fruits. The fruits varied in colour and size. Some of them were green, orange or red and their size ranged from 1 to nearly 5 cm in diameter (Fig. 2). The percentage of abnormal development, both vegetative and reproductive (dwarf plants and abnormal development of flowers) under greenhouse conditions was very high compared to the plants obtained in the first assay.

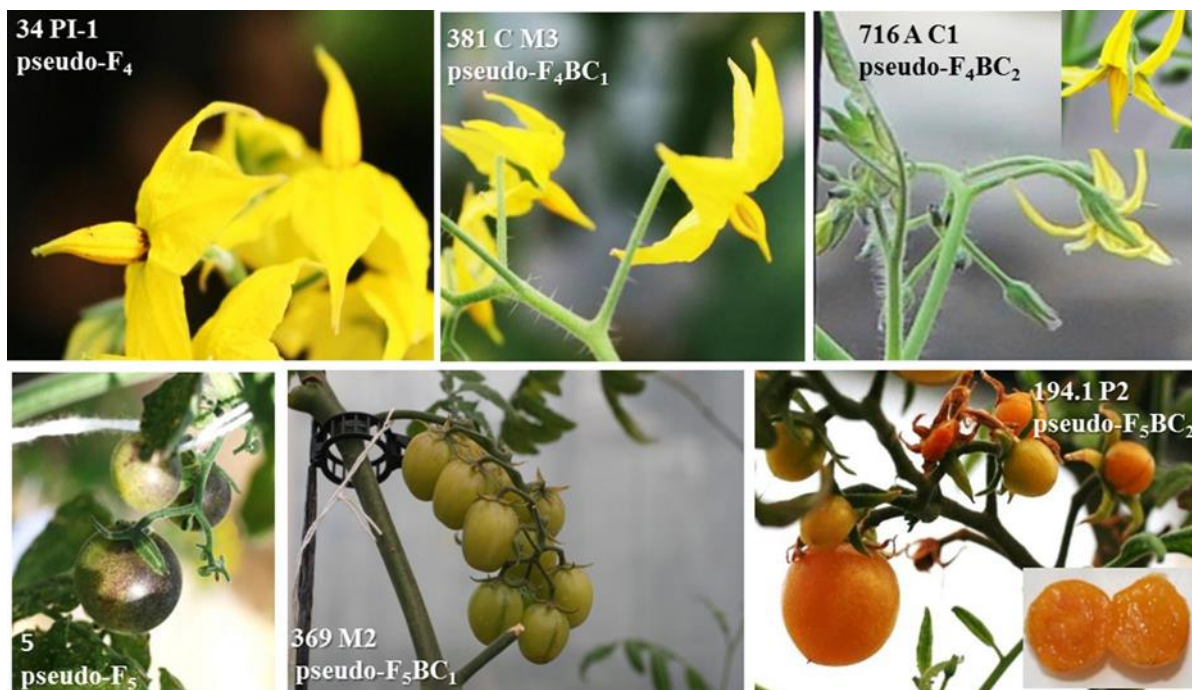


Fig. 1 Progressive changes on flower characteristics (stigmatic exertion, petal size), presence of trichomes, and size and colour of fruits across backcross generations from *Solanum peruvianum* to *S. lycopersicum*

Third assay: obtaining of the pseudo-F_nBC₂ and pseudo-F₅BC₃ generations

A third assay was performed in order to increase the number of progeny derived of *S. peruvianum*. Nineteen plants were used as male parents and crossed to FC. Seventeen of them belonged to pseudo-F_nBC₁ generations obtained in the first assay. The other two belonged to pseudo-F₅BC₂ generation obtained in the second assay. Three of the male parents were common to the second and third assays (Tables 4, 5). As in the second assay fruits were collected at 25, 30 and 35 dap and seeds cultured in M2. In this last assay, a new factor was introduced: previous to their culture, half of the seeds of each fruit were cut in the chalazal region to facilitate the contact of the embryo with the medium and cultured.

Results obtained using male parents of the pseudo- F_nBC₁ and pseudo-F₅BC₂ generations will be presented separately.

Male parents of pseudo-F_nBC₁ generation

The number of crosses made with each parent was always limited to the amount of flowers and pollen available at the time of pollination. In this assay, a total of 485 fruits were obtained and 4788 seeds were cultured (2422 plated directly and the 2366 after making a small cut in the chalazal region). As in the second assay very small undeveloped seeds were discarded. Some open seeds were randomly selected to observe the state of development of the embryo; most of them were in torpedo and cotyledon stage. Globular and heart stage were observed in fruits at 25 dap and in low proportion.

Table 4 Number of fruits, plated seeds and plants regenerated in the Second assay

Generation	Parent	No. fruits	Number of plated seeds	Number of plant			No. plants/ fruit	No. Plants/ Platted Sedes
				Coming from direct germination	Developed from calli	Total number of plants		
pseudo-F ₄ BC ₁	163 C M2	38	335	10	4	14	0.37	0.04
	304 C M2 pl 1	23	252	1	7	8	0.35	0.03
	304.1 C M2	24	305	16	9	25	1.04	0.08
	381 C M3	24	133	4	2	6	0.25	0.05
pseudo-F ₅ BC ₁	97 A M2	22	228	3	5	8	0.36	0.04
	102 A M2	39	542	11	6	17	0.44	0.03
	124 C M2	7	42	2	1	3	0.43	0.07
	124 C M3	42	527	12	16	28	0.67	0.05
	193 C M2 pl 1	9	142	0	1	1	0.11	0.01
	215 C M3 pl 1	9	157	2	1	3	0.33	0.02
	230 C M2	18	296	13	8	21	1.17	0.07
	231 C M2 pl 1	25	259	3	2	5	0.20	0.02
	240 C M3 pl 1	25	257	4	8	12	0.48	0.05
	292 C M2 pl 1	4	62	0	0	0	0.00	0.00
	327 C M2	16	121	1	1	2	0.13	0.02
	369 C M2	61	1710	31	16	47	0.77	0.03
	385 C M3	36	468	6	8	14	0.39	0.03
pseudo-F ₆ BC ₁	45 A M2	30	353	23	12	35	1.17	0.10
	46 A M2	20	157	3	1	4	0.20	0.03
	179 PI-4	17	131	3	3	6	0.35	0.05
	265 C M2	110	2059	58	39	97	0.88	0.05
	Total/Mean	599	8536	206	150	356	0.48	0.04

A total of 217 plants were obtained, most of them came from direct germination (78.34%) and the rest after callus development (Table 5).

The cut performed in half of the seeds had a positive effect on the regeneration of plants, both by embryo germination or after a phase of callus development. From the 217 plants obtained, 197 were developed from cut seeds and only 20 from the entire ones. In both cases direct germination was the main way of development.

The number of plants regenerated per fruit was very similar from fruits collected at 25 and 30 dap and higher than from fruits collected at 35 dap (Table 3). Sixty plants have been acclimated and are being studied at present. Some of them did not develop giving stunted plants, while other grown normally and set fruits.

Male parents of pseudo-F₅BC₂ generation

Two plants obtained in the second assay, were used as male parents and backcrossed once more to FC to obtain pseudo-BC₃ generation. Thirty-four fruits were obtained and 435 seeds were platted, discarding too small seeds. Again, a half of them were cultured after making a small cut. A total of 122 plants were regenerated (78 from 12.2 P1 and 44 from 70 P1), 86.9% developed by direct germination of the embryo. The cut performed in the seeds increased the efficiency of the technique as in the crosses performed with the male parents belonging to the pseudo-F_n-BC₁ generations. Approximately half of the plants were obtained from entire seeds and the other half from cut seeds. The efficiency of the technique was much higher with the BC₂ male parents, allowing the regeneration of 3.70 plants per fruit and 0.30 plants per seed platted. The number of plants per fruit was higher when fruits were collected at 25 dap (Table 3).

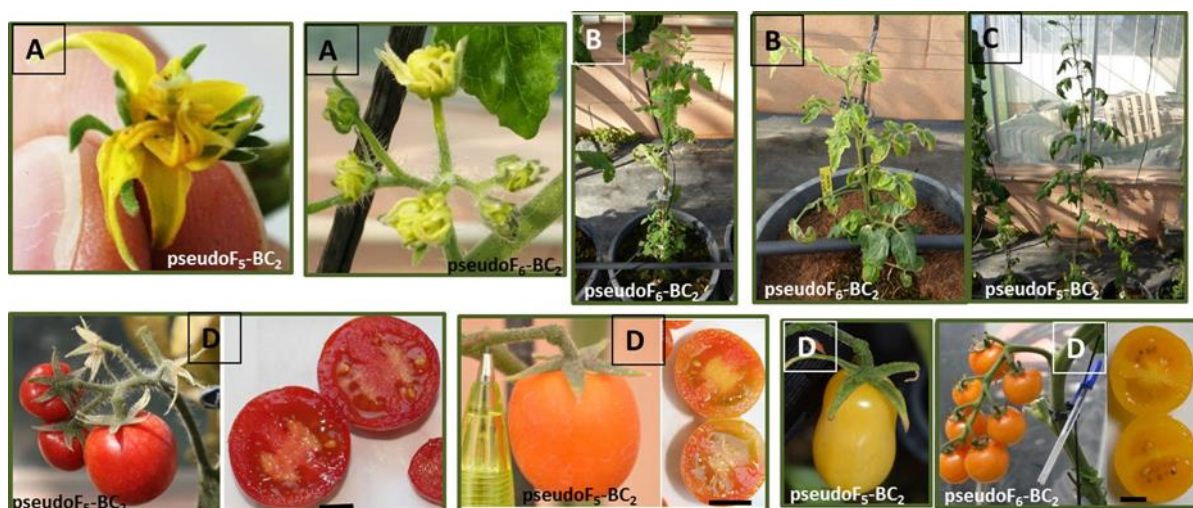


Fig. 2 Phenotypic characteristics of some plants obtained in the second assay. **a** Abnormal flower, **b** abnormal growth at 2 months after transplant: plants did not develop inflorescences and stop growing, **c** normal growth at 3 months after transplant, **d** variability in colour, shape and size of some fruits. Black bar 1 cm

Some fruits were harvested when completely ripen to check the development and appearance of the seeds. Fruits coming from 12.2 P1 and 70 P1 had a high proportion of seeds fully developed. In contrast plants coming from another BC₂ parent also used in crosses to FC had fruits lacking normal seeds or with only a few seeds with normal appearance. No seeds were rescued and cultured in vitro from crosses with this parent, because all fruits set were allowed to reach complete ripeness. This indicates that even in the BC₃ generation incompatibility, although diminished, is still present in materials derived from PI 126944.

Eighty plants were acclimated (47 derived from 12.2 P1 and 33 from 70 P1). Plants derived from 12.2 P1 were all similar and had intermediate phenotype between tomato and *S. peruvianum*, with red ripe fruits and absence of pilosity on the whole plant. In contrast plants derived from 70 P1 were much more similar to *S. lycopersicum*, as well as the parent 70 P1.

Table 5 Number of fruits, platted seeds and plants regenerated in the Third assay

Generation	Parent	Number of fruits	Number of platted seeds	Plants developed from cut seeds			Plants developed from entire seeds			Total number of plants	No. plants/fruit	No. plants/platted seeds
				Coming from direct germination	Developed from calli	Subtotal	Coming from direct germination	Developed from calli	Subtotal			
pseudo-F _n BC ₁ generation												
pseudo-F ₄ BC ₁	41 E M3	18	84	4	0	4	1	0	1	5	0.28	0.06
	285 M2 pl 1	57	805	32	8	40	2	0	2	42	0.74	0.05
	381 M3	50	508	14	4	18	1	1	2	20	0.40	0.04
pseudo-F ₅ BC ₁	67 A M3	8	38	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00
	171 A M3	11	78	3	1	4	0	0	0	4	0.36	0.05
	272 M2	51	514	17	6	23	2	0	2	25	0.49	0.05
	292 M2 pl 1	90	849	33	11	44	3	0	3	47	0.52	0.06
	327 M2	31	248	5	2	7	2	0	2	9	0.29	0.04
	367 M2	43	503	12	6	18	1	2	3	21	0.49	0.04
	367.1 M3	9	73	2	0	2	1	0	1	3	0.33	0.04
	378.1 M3	12	143	5	0	5	1	0	1	6	0.50	0.04
	385.1 M2	21	246	15	3	18	1	1	2	20	0.95	0.08
	pseudo-F ₆ BC ₁	13 A M3 callo 2	8	55	0	0	0	0	0	0	0	0.00
13 A M3 callo 3		8	54	1	0	1	0	0	0	1	0.13	0.02
300 M2 pl 1		25	236	1	0	1	0	0	0	1	0.04	0.004
510 C1		31	255	3	1	4	0	0	0	4	0.13	0.02
IAA + 2IP Fr 385		12	99	7	1	8	1	0	1	9	0.75	0.09
Total/Mean		485	4788	154	43	197	16	4	20	217	0.45	0.05
pseudo-F ₅ BC ₂ generation												
pseudo-F ₅ -BC ₂	12.2 P1	23	311	29	8	37	38	3	41	78	3.39	0.25
	70 P1	11	124	20	5	25	19	0	19	44	4.00	0.35
Total/Mean		34	435	49	13	62	57	3	60	122	3.70	0.28

DISCUSSION

The results shown in this paper take part of a research line with the final objective of developing a set of introgression lines from *S. peruvianum* PI 126944 into the genetic background of the cultivated tomato. Several hybrids were obtained previously from a cross between the tomato line NE-1 and this accession by in vitro culture of immature open seeds (Picó et al., 2002). By crossing two of these hybrids an abundant pseudo-F₂ progeny was obtained. This crosses scheme was repeated until the pseudo F₆ generation. In this work several plants from the pseudo-F₄, pseudo-F₅ and pseudo-F₆ generations have been crossed to the tomato line FC to obtain F_nBC₁ generation. These plants were later crossed to FC producing the F_nBC₂ and F_nBC₃ generations (Julián et al., 2013). Genotyping of the materials is in progress. The aim of this paper is to describe the in vitro culture assays performed to obtain a high number of descendants.

The BC₁ generation from *S. peruvianum* has been proven to be as difficult to obtain as the F₁ hybrid. In our case the efficiency measured as the number of plants per fruit has been low ranging from 0.05 to 0.54, depending on the male parent. Imanishi (1988) found that F₁ and BC₁ embryo culture had similar efficiencies and Cap et al. (1993) were unable to produce any BC₁ plant from the hybrid plant they regenerated from callus culture. Also, Encina et al. (2012) found extremely difficult to obtain the backcross to tomato. However, these results contrast with the ones obtained by Doganlar et al. (1997). These authors reached high percentages of germination of the cultured embryos ranging from 0.24 to 0.88 with an average of 0.62. These apparent discrepancies among experiments can be explained by the different methodologies used. Selection of immature seeds, number of days from pollination to harvest of fruits, culture medium and female and male parents are some of the factors that vary among these experiments. This makes difficult the comparison of the efficiency between experiments. In any case our contribution is another evidence of the extreme difficulty in obtaining BC₁ generation

Doganlar et al. (1997) obtained BC₂ populations from BC₁ plants. They reported that embryo rescue was not necessary as BC₁ showed greater fertility than the F₁ generation. The 29% of their BC₁ plants selfed spontaneously giving BC₁F₂ seeds. They used two of these self-compatible plants to obtain BC₂ descendants producing fruits with viable seeds when completely ripen. In our case the self-compatibility of BC₁ plants was much lower; only a 10% set a few fruits with very few seeds. These plants were included

as male parents in the second experiment and did not behave better than the self-incompatible BC₁ plants. In our case, due to the very low self-compatibility found in our BC₁ plants, it was necessary to do immature seed culture also for obtaining the BC₂ generation. As expected, the efficiency to obtain BC₂ generation was higher than to obtain BC₁. The number of plants regenerated per fruit ranged from 0.04 to 1.17, depending on the male parent used with a mean of 0.47. These yields are clearly higher than the ones obtained to produce the BC₁ with a mean of 0.2 plants per fruit and minimum and maximum values of 0.05 and 0.54 respectively (male parents producing no plants were eliminated because of the very low number of fruits obtained). Obviously, the increase in the efficiency is due to the progressive overcome of the incompatibility. The self-fertility of BC₂ generation obtained in the second assay increased until 16% of the acclimated plants. These plants produced fruits with apparently normal seeds. However, this percentage is low and fruits of many plants did not set seeds. This is because we decided to use immature seeds recue to produce BC₃. With the two parents used the number of descendants was numerous, demonstrating that in this generation the incompatibility barriers have been overcome. In some cases, the fruits that were allowed to ripe completely in the plant contained fully developed seeds. Although it has to be pointed that in other cases we still found some fruits with no developed seeds.

Plants of BC₂ and BC₃ generations were obtained mainly through embryo germination (57.5 and 78.34% respectively for the second and third assays) and at a less extent after a callus phase. This could be due to the progressive overcome of the incompatibility when using the BC₁ and BC₂ plants that lead to the normal development of seeds via germination.

The effect of the female parent in the efficiency of obtaining descendants with the *peruvianum* complex has been demonstrated in previous works, which concluded that selecting tomato genotypes for high general crossability can improve the efficiency of introgressing genes from this species (Imanishi 1988; Chen and Imanishi 1991; Sacks et al., 1997). Differences in earliness, fruit size and other characteristics related to fruit development and ripening could be an explanation of this behaviour. In this sense, the lack of differences between the two female parents used in this work could explain their similar behaviour about the production of regenerants. Regarding the male parent, the existence of variation between different accessions of *S. peruvianum* about their suitability in crosses to tomato has also been shown (Imanishi 1985; Segeren et al., 1993;

Pratta et al., 1999). All male parents used in this work derive from the same *S. peruvianum* accession, although the amount of *S. peruvianum* genome differs among them. Perhaps this could be an explanation for the high differences found with regard to their suitability to be crossed to *S. lycopersicum*.

The composition of the culture media had a strong effect on the response of immature seeds in our experiment. In fact, no seed cultured in M1 gave any plant. This result contrasts with the one obtained by Thomas and Pratt (1981). These authors obtained the production of callus up to 12% of undeveloped seeds that were plated on the same callus-inducing medium. Some regeneration was also found in previous assays of our group working with this medium to obtain the initial plant materials derived from PI 126944 (Julián et al., 2013). The shoot induction media 2 and 3 have similar growth regulator and concentrations than those reported by Trujillo-Moya et al. (2011) and, Trujillo-Moya et al. (2014), respectively. In these work, these media were used to regenerate plants from leaf explants of different accessions of cultivated tomato, *Solanum pennellii* and *S. peruvianum*. In the present work, regeneration was obtained from seeds in all the crosses with M2 and in 70% of them with M3.

Seed cultured with shoot induction media can germinate or regenerate the novo directly or indirectly previous callus formation. In the first assay, the regeneration of plants previous callus formation was the predominant response in both responding media M2 (61.7%) and M3 (63.3%). In the second one, 42.1% of plants also regenerated after callus formation. Regeneration previous callus formation as an intermediate step on the developmental process of embryos has been reported repeatedly by other authors when obtaining the interspecific hybrids (Cap et al., 1991; Segeren et al., 1993; Julián et al., 2013) or the BC₁ (Thomas and Pratt 1981), even using different combinations of auxins and cytokinins in their culture media.

The number of days between pollination and harvest of the fruits is another factor strongly influencing the response. The best dates reported are very variable. Barbano and Topoleski (1984) concluded that the hybrid embryos degenerated completely 17 days after pollination, while Segeren et al. (1993), delayed the nearly 100% embryo abortion to 25 dap. In contrast Thomas y Pratt (1981) concluded that fruits collected 35 dap had the highest percentage of seeds forming callus. Silva Da Costa Ribeiro and de Britto Giordano (2001) harvested fruits aged between 25 and 68 days, reporting a higher rate of plant regeneration at 38 days. In our case the best option differed according to the assay,

being the best date 35 dap when obtaining the BC₁ and less dap for the BC₂ and BC₃ generations. Apart from the degeneration of the embryo, other factors as the specific development of the fruit and earliness of the female parent can influence the final result. In fact, Thomas and Pratt (1981) used 35 or 40 dap depending on the tomato variety used. Other possible effect no tested is the developmental stage of the flower when emasculated. In fact, evident differences are frequently observed in size of fruits developed from flowers emasculated at the same date. This can be consequence of slight differences in the developmental stage of the flower when emasculated and the quality of the pollination. So, the more suitable number of days after pollination seems to be an unpredictable factor that needs to be studied in more detail.

Another factor contributing to improve the results is the visual immature seed selection out of seeds with higher probabilities to progress. Imanishi et al. (1985) and Imanishi (1988) estimated that 20–30% of the ovules platted will germinate if the ovules are selected on the basis of the size, colour and shape. In our case the selection made in the second and third assays was limited to reject too small and undeveloped seeds but it seems that it had a positive effect increasing notably the efficiency, especially in seeds coming from fruits collected at 25 and 30 dap. Other factor as the overcome of the incompatibility can also be involved in this response.

Cutting the seeds to facilitate the expansion of the embryo has been suggested by some authors to improve the regeneration of plants from immature seeds in tomato (Doganlar et al., 1997; Pratta et al., 1999) and other species (Tezuka et al., 2013; Peiró et al., 2015). This had a strong positive effect in the third experiment since the 90.78% of plants were regenerated from cut seeds. In the same way Pratta et al. (1999) reported that they obtained plants only from cut seeds.

We conclude confirming the difficulty in producing BC₁ from *S. peruvianum* as it is highly dependent on many factors related to the parents, culture medium and other environmental factors. Based on the literature and in our experiments, we confirm that the visual selection of immature seeds and making a cut on the chalazal region of the seeds seem to be controllable factors that contribute to notably improve the efficiency of the production of F₁, BC₁ and BC₂ plants from crosses between tomato and *S. peruvianum*. Other factor as the day after pollination is more unpredictable and dependent on the female parent and other environmental factors.

Acknowledgments

This research was partially financed by project AGL2011-30083 funded by Ministerio de Ciencia e Innovación. Gabriela Campos was granted a scholarship by ERASMUS Mundus. The authors wish to thank M. Estarlich, I. di Lolli, P. Muñoz, M. Ros and E. Zafón for their technical assistance.

REFERENCES

- Bai Y, Lindhout P (2007) Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future? *Annals of Botany* 100:1085-1094
- Barbano PP, Topoleski LD (1984) Postfertilization hybrid seed failure in *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon peruvianum* ovules. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 109:95-100
- Cap GB, Roberts PA, Thomason IJ, Murashige T (1991) Embryo culture of *Lycopersicon esculentum* x *L. peruvianum* hybrid genotypes possessing heatstable resistance to *Meloidogyne incognita*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 116:1082-1088
- Cap GB, Roberts PA, Thomason IJ (1993) Inheritance of heat- stable resistance to *Meloidogyne incognita* in *Lycopersicon peruvianum* and its relationship to the *Mi* gene. *Theoretical and Applied Genetics* 85:777–783
- Chen L, Adachi T (1992) Embryo abortion and efficient rescue in interspecific hybrids, *Lycopersicon esculentum* and the “*peruvianum*” complex. *Japanese Journal of Breeding* 42:65-77
- Chen L, Adachi T (1995) Mechanism of abortion of postfertilization hybrid embryo in interspecific backcross, *Lycopersicon esculentum* x (*L. esculentum* x *L. peruvianum*). *Cytologia* 60:123–131
- Chen L, Imanishi S (1991) Cross-compatibility between the cultivated tomato *Lycopersicon esculentum* and the wild species *L. peruvianum*, *L. chilense* assessed by ovule culture in vitro. *Japanese Journal of Breeding* 41:223-230

- da Costa Silva, Ribeiro C, Britto Giordano L (2001) Método de obtenciao de híbridos interespecíficos entre *Lycopersicon esculentum* e *L. peruvianum*. Pesquisa Agropecuária Brasileira 36:793-799
- Doganlar S, Frary A, Tanksley SD (1997) Production of interspecific F₁ hybrids, BC₁, BC₂ and BC₃ populations between *Lycopersicon esculentum* and two accessions of *Lycopersicon peruvianum* carrying new root-knot nematode resistance genes. Euphytica 95:203-207
- Encina CL, Carmona-Martin E, Fernández-Muñoz R (2012) Embryo rescue of *Solanum lycopersicum* x *S. peruvianum* tomato cross for ToCV resistance. Acta Horticulturae 935:91-94
- Fulton TM, Nelson JC, Tanksley SD (1997) Introgression and DNA marker analysis of *Lycopersicon peruvianum*, a wild relative of the cultivated tomato, into *Lycopersicon esculentum*, followed through three successive backcross generations. Theoretical and Applied Genetics 95:895-902
- Hogenboom NG (1972) Breaking breeding barriers in *Lycopersicon*. 4. Breakdown of unilateral incompatibility between *L. peruvianum* (L.) Mill. and *L. esculentum* Mill. Euphytica 21:397-404
- Imanishi S (1988) Efficient ovule culture for the hybridization of *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum*. *L. glandulosum*. Japanese Journal of Breeding 38:1-9
- Imanishi S, Nagata N, Hiura I, Watanabe Y (1985) Studies on the interspecific crosses between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum*. 2 Varietal difference in *L. peruvianum* and in the in vitro culture in the first backcross. Japanese Journal of Breeding 35:88-89
- Julián O, Herráiz J, Corella S, diLolli I, Soler S, Díez MJ, Pérez de Castro A (2013) Initial development of a set of introgression lines from *Solanum peruvianum* PI 126944 into tomato: exploitation of resistance to viruses. Euphytica 193:183–196
- Kharkongar HP, Khanna VK, Tyagi W, Rai M, Meetei NT (2013) Wide hybridization and embryo-rescue for crop improvement in *Solanum*. Agrotechnology S 11:004. doi:10. 4172/2168-9881.S11-004

- Muniyappa V, Jalikop SH, Saikia AK, Chennarayappa Shivashankar G, Ishwara Bhat A, Ramappa HK (1991) Reaction of *Lycopersicon* cultivars and wild accessions to *Tomato leaf curl virus*. *Euphytica* 56:37-41
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497
- Paterson RG, Scott SG, Gergerich RC (1989) Resistance in two *Lycopersicon* species to an Arkansas isolate of tomato spotted wilt virus. *Euphytica* 43:173-178
- Peiró R, Gammoudi N, Yuste A, Olmos A, Gisbert C (2015) Mature seeds for in vitro sanitation of the Grapevine leaf- roll associated virus (GLRaV-1 and GLRaV-3) from grape (*Vitis vinifera* L.). *Spanish Journal of Agricultural Research* 13: e1005
- Peralta IE, Spooner DM, Knapp S (2008) The taxonomy of tomatoes: a revision of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*) and their outgroup relatives in sections *Juglandifolia* and *Lycopersicoides*. *Systematic Botany Monographs* 84:1-186
- Picó B, Díez MJ, Nuez F (1998) Evaluation of whitefly-mediated inoculation techniques to screen *Lycopersicon esculentum* and wild relatives for resistance to Tomato yellow leaf curl virus. *Euphytica* 101:259-271
- Picó B, Herráiz J, Ruíz JJ, Nuez F (2002) Widening the genetic basis of virus resistance in tomato. *Scientia Horticulturae* 94:73-89
- Pilowsky M, Cohen S (2000) Screening additional wild tomatoes for resistance to the whitefly-borne *Tomato yellow leaf curl virus*. *Acta Physiologiae Plantarum* 22:351-353
- Pratta G, Zorzoli R, Picardi LA (1999) Obtención y micropropagación de híbridos intra e interespecíficos de tomate (género *Lycopersicon*). *Biotecnología Aplicada* 16:242-245
- Rick CM (1983) Crossability between *L. esculentum* and a new race of *L. peruvianum*. *Report of the Tomato Genetics Cooperative* 33:13
- Rick CM (1986) Reproductive isolation in the *Lycopersicon peruvianum* complex. In: Arcy WGD (Ed) *Solanaceae, biology and systematics*. Columbia University Press, New York, pp. 477-495

- Rick CM (1988) Tomato-like nightshades: affinities, autecology, and breeders opportunities. *Economic Botany* 42:145-154
- Rowe RC, Farley JD (1981) Strategies for controlling *Fusarium* crown and root rot in greenhouse tomatoes. *Plant Disease* 65:107-112
- Sacks EJ, Gerhardt LM, Graham EB, Jacobs J, Thorrup TA, St. Clair DA (1997) Variation among 41 genotypes of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. for crossability to *L. peruvianum* (L.) Mill. *Annals of Botany* 80:469-477
- Segeren MI, Sondahl MR, Siqueira WJ, Medina Silho HP, Nagai H, Lourenciao AL (1993) Tomato Breeding: 1. Embryo rescue of interspecific hybrids between *Lycopersicon esculentum*, MILL. and *L. peruvianum* (L.) MILL. *Revista Brasileira de Genética* 16:367-380
- Smith PG (1944) Embryo culture of a tomato species hybrid. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 44:413-416
- Stevens MA, Rick CM (1986) Genetics and breeding. In: Atherton JG, Rudich J (Ed) *The TOMATO Crop. A Scientific Basis for Crop Improvement*. Chapman and Hall, London
- Tezuka T, Yokoyama H, Tanaka H, Shiozaki S, Oda M (2013) Factors affecting seed germination of *Ilex latifolia* and *I. rotunda*. *HortScience* 48:352–356
- Thomas BR, Pratt D (1981) Efficient hybridization between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum* via embryo callus. *Theoretical and Applied Genetics* 59:215-219
- Trujillo-Moya C, Gisbert C, Vilanova S, Nuez F (2011) Localization of QTLs for in vitro plant regeneration in tomato. *BMC Plant Biology* 11:140
- Trujillo-Moya C, Peiró R, Gisbert C (2014) Leaf morphology and shoot regeneration of in vitro cultured explants from species of the *Solanum peruvianum* s.l. complex. *Turkish Journal of Botany* 38:465-476
- Yamakawa K, Nagata N (1975) Three tomato lines obtained by use of chronic gamma radiation with combined resistance to TMV and *Fusarium* race J-3, vol 16. *Technical News, Institute of Radiation Breeding, Ohmiya*, p 2

Evaluation under diverse conditions of a differential host reaction scale to Tomato yellow leaf curl virus in tomato

Ana Pérez-de-Castro, Gabriela Campos, Olga Julián, Francisco Dueñas, Marta Álvarez, Yamila Martínez-Zubiaur y María José Díez

Phytopathologia Mediterranea (2017) 56, 1, 50–61

SUMMARY

Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) is the most widespread virus species causing Tomato yellow leaf curl disease. Accurate methods for assessment of resistance are requisite in breeding programs. Researchers at the Volcani Center (Israel) developed a scale of differential TYLCV reactions in seven non-segregating tomato host lines, with virus responses ranging from susceptible to highly resistant. In the present work, this scale has been evaluated with inoculation and assessment methods routinely used by two different research groups, in Spain and Cuba. Different TYLCV isolates, inoculation methods, plant ages, and environmental conditions were compared. Symptom scores of the tomato lines were generally lower in the conditions assayed in both locations than those originally described. Reaction ranking order of the standard tomato lines was more similar to the original description in the assays carried out in Spain. However, response of the lines to TYLCV obtained in both locations did not correspond to scale grades for most of the conditions. A large difference between symptom scores in the susceptible and the resistant lines was observed, with the range in the resistant lines being narrow. These results indicate that the number of standard lines used could be reduced, selecting the most susceptible and the most resistant lines, and one with intermediate resistance. All the factors evaluated affected symptom development. This highlights the importance of establishing a standard inoculation method, experimental conditions, evaluation period and appropriate resistance evaluation criteria, to ensure precise evaluation of genotype responses.

Key words: TYLCV, *Solanum lycopersicum*, whitefly inoculation, agroinoculation

INTRODUCTION

Tomato yellow leaf curl disease (TYLCD) is caused by a complex of whitefly-transmitted virus species belonging to the genus *Begomovirus*, family *Geminiviridae* (King et al., 2011). This disease is one of the major limitations of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivation in tropical and subtropical regions (Hanssen et al., 2010). The most widespread species causing TYLCD is *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). Strategies to manage the disease mainly rely on controlling the insect vector populations (Lapidot et al., 2006). However, these measures are not completely effective, especially under high inoculum pressures or early infections. Breeding resistant tomato varieties is likely to be the best long-term approach to control the disease.

Several host genes conferring resistance to TYLCD have been described, derived from different wild tomato relatives (Caro et al., 2015). Some have been transferred to cultivated tomato, aiming to develop resistant cultivars. However, available commercial varieties are not a definitive solution, as they do not provide total resistance. Several research groups are still searching for new sources of resistance to TYLCD.

Availability of accurate methods for the assessment of the levels of disease resistance is an important requisite in plant breeding programmes. From a breeding perspective, the most important parameter to evaluate resistance is the yield loss caused by infections. It would be desirable to measure this effect in TYLCD-resistant materials, comparing yield and yield components in infected and uninfected plants (Lapidot et al., 1997, 2006). However, these tests are only affordable for advanced breeding lines due to the costs of their development (Lapidot and Friedmann, 2002). Accumulation of virus DNA has been used as an indicator of the resistance levels (Zakay et al., 1991; Fargette et al., 1996). However, the correlation between viral accumulation and the effects on yield is not valid for intermediate levels of resistance; so, virus accumulation is not recommended as the sole indicator of relative resistance (Lapidot et al., 1997). The most directly observable criterion to evaluate resistance is symptom severity induced by infection, and most of the inheritance studies for resistance to TYLCD have been based on symptom development (Pérez de Castro et al., 2007). The threshold to consider a plant as resistant is variable. In most assays, only asymptomatic plants have been classified as resistant (Hassan et al., 1984; Kasrawi, 1989; Pilowsky and Cohen, 1990). In contrast, other authors have established the limit score in slight symptoms that would not produce

appreciable yield losses (Kasrawi and Mansour, 1994; Pérez de Castro et al., 2007; Pérez de Castro et al., 2013). Nevertheless, several factors, such as plant age at the time of inoculation, inoculation pressure, and growing conditions can affect the responses to begomovirus infection (Picó et al., 1998; Lapidot et al., 2000; Lapidot et al., 2006; Levy and Lapidot, 2008). Moreover, the level of phenotypic expression of the distinct resistance genes is probably affected by environmental conditions and the virus isolate/species (Picó et al., 1998; Lapidot et al., 2000; Pérez de Castro et al., 2005; Pereira-Carvalho et al., 2015).

Lapidot et al. (2006) developed a scale for differentiating reactions to TYLCV in tomato hosts. The scale employs seven non-segregating host lines with reactions to TYLCV ranging from susceptible to highly resistant. One of the inbred lines, 'STY-1', is included as the susceptible standard, and the other six lines were derived from resistant material originating from different wild tomato relatives. The lines 'STY-2' to 'STY-5' are derived from resistant hybrids developed by different seed companies, while 'STY-6' and 'STY-7' are derived, respectively, from the Volcani Center breeding lines 'TY197' and 'TY172' (Lapidot et al., 1997). The scale was tested under different environmental conditions (greenhouse and open field) and using different plant ages. Symptom severity and virus accumulation were measured, and the yield loss induced by TYLCV infection was evaluated under field conditions. The ranking of the lines according to symptom scores was stable across the different experimental conditions, except for one genotype (Lapidot et al., 2006). This scale was recommended to determine and compare the level of resistance to TYLCD in evaluation assays. The scale has also been tested by whitefly-mediated inoculation in cages with an Australian isolate of TYLCV (Van Brunshot et al., 2010). However, the symptom scores obtained were systematically lower than in the assays carried out by Lapidot et al. (2006). These results demonstrate the need to test this set of standard tomato lines under different experimental conditions.

The objective of the present study was to evaluate the levels of resistance exhibited by the standard tomato lines of Lapidot et al. (2006) under experimental conditions employing inoculation and assessment methods routinely used by two different research groups (in Spain and Cuba). Different TYLCV isolates, inoculation methods, plant ages, and environmental conditions were compared.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

The seven STY lines (provided by Lapidot, Volcani Center, Israel) that comprise the standards of the TYLCV resistance scale developed by Lapidot et al. (2006) were evaluated using the inoculation and assessment methods routinely used in two different research institutions in Spain and in Cuba (Table 1). Four assays (assay 1 to assay 4) were carried out at the ‘Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana’ (Valencia, Spain), and three assays (assay 5 to assay 7) were carried out at the ‘Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas’ (San José de las Lajas, Cuba). The first two assays were developed in 2008, in, respectively, spring-summer (assay 1) and autumn-winter season (assay 2). Assays 3 and 4 were carried out simultaneously in 2012, during the spring-summer season, but used inoculated plants of different ages. In these four assays, ten plants per line were employed in each of the different experimental conditions. Ten to 20 plants of the breeding line ‘Fortuna C’ (‘FC’) were used as susceptible controls in all assays. Ten plants of the introgression line ‘TY52’, carrying the Ty-1 gene (Michelson et al., 1994), were included as resistant controls in the two assays carried out in 2012. Assays 5 and 6 were conducted in 2009, in, respectively, spring-summer and autumn-winter seasons. Assay 7 was carried out in the summer of 2011. In assays 5, 6 and 7, ten plants per host line were inoculated. Also, ten plants each of cultivar ‘Campbell 28’ and the introgression line ‘TY52’ were used, respectively, as the susceptible and resistant controls.

Table 1. Environmental conditions, inoculation method and disease assessment used in the different assays described in this study

Assay	Location	Season ^c	Isolate	Control	Inoculation	Assessment ^d
1	Spain ^a	SS	TYLCV-Mld[ES:72:97]	'Fortuna C'	Whitefly cage inoculation	S
2		AW	TYLCV-Mld[ES:72:97]	'Fortuna C'		S/A
3		SS	TYLCV-Mld[ES:72:97]	'Fortuna C' and 'TY52'		S
4		SS	TYLCV-Mld[ES:72:97]	'Fortuna C' and 'TY52'		S
5	Cuba ^b	SS	TYLCV-IL[CU]	'Campbell 28' and 'TY52'	Whitefly mass inoculation	S/A
6		AW	TYLCV-IL[CU]	'Campbell 28' and 'TY52'	Whitefly mass inoculation	
7		S	TYLCV-IL[CU]	'Campbell 28' and 'TY52'	Agroinoculation	

^a 'Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana' (Valencia, Spain).

^b 'Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas' (San José de las Lajas, Cuba).

^c SS, spring-summer; AW: autumn-winter; S: summer.

^d S, Symptom evaluation; A: Viral accumulation.

Inoculation methods

Inoculation was carried out as routinely done in each of the research institutions. Whitefly-mediated inoculations (under growth chamber conditions) using muslin-covered cages were used in the four assays in Spain. Conditions in the growth chamber were: 25°C, relative humidity 60 to 65% (day) and 95 to 99% (night), irradiance 34 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ and a 16 h light 8 h dark daily cycle. The whitefly population used was classified as *Bemisia tabaci* biotype Q (supplied by F. Beitia, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, IVIA, Valencia, Spain) and the insects became viruliferous by feeding on tomato plants infected with the Spanish isolate of TYLCV-Mld [ES:72:97] (accession No. AF071228). Stage for inoculation varied depending on the assay. In assays 1 and 2 plants were inoculated at the three true leaf stage. To test applicability of the scale with plant inoculation at different host stages, plants were inoculated 14 days after sowing (das) in assay 3 and 28 das in assay 4. In all cases, plants were randomly distributed inside cages, with 50 whiteflies per plant for seven days. During the inoculation period plants were shaken daily to ensure the uniform distribution of the whiteflies. After the inoculation period, plants were sprayed with imidacloprid (Confidor, Bayer). Two days

later, plants were transplanted to 12 L capacity pots filled with coconut fibre, transferred to an insect-proof greenhouse, and organized in randomized block experimental design. Plants were cultivated under controlled temperature and light conditions, and fertirrigated with the doses and frequency recommended for standard tomato cultivation.

Two different inoculation methods were used in the assays carried out in Cuba. Whitefly mediated mass inoculation was conducted in assays 5 and 6. Air temperature in the greenhouse was $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Whiteflies were *B. tabaci* and they became viruliferous by feeding on tomato plants infected with the isolate TYLCV-IL[CU] (accession No. AJ223505). Plants were inoculated at the two true leaf stage, with high inoculum pressure (≈ 100 whiteflies/ plant), for 2 days. During the inoculation period, plants were shaken three times each day to ensure the uniform distribution of the whiteflies. After the inoculation period, plants were sprayed with imidacloprid (Confidor, Bayer) and then transplanted to beds in open field in a completely randomized experimental design. Agroinoculation was used in assay 7. The bacterial strain was LBA 4404 of *Agrobacterium tumefaciens* transformed with a dimeric copy of the viral genome of TYLCV-IL[CU] (Fuentes et al., 2006). Bacterial cultures were grown for 48 h at 28°C in YEB medium supplemented with 50 mg L⁻¹ rifampicin, 100 mg L⁻¹ streptomycin, and 30 mg L⁻¹ kanamycin. Cells were concentrated by centrifugation, suspended in MS liquid medium containing 0.2% acetosyringone, and immediately used for inoculation. Plants were inoculated at the two-true leaf stage by injection of the bacterial suspension into the leaf axils, and were then maintained in a greenhouse at 28°C - 24°C (day/night) and $80 \pm 10\%$ relative humidity.

Disease assessments

The disease assessments were carried out according to the protocols developed by each research institution. The scale used for all the assays was that proposed by Friedmann et al. (1998), with scores ranging from 0 (asymptomatic plant, inoculated plants show the same growth and development as non-inoculated plants) to 4 (very severe stunting and yellowing, and pronounced leaf cupping and curling; plant ceases to grow). Intermediate scores (0.5, 1.5, 2.5, or 3.5) were also used to obtain more precise evaluations. For assays 1 to 4, symptom development was scored at 15, 25, 35, 45, and 55 days post-inoculation (dpi), while for assays 5 to 7, the assessments were at 15, 30 and 45 dpi. The statistical significance of the different factors applied in the assays was

calculated by ANOVA, and mean severity scores were compared using Fisher LSD at $P=0.05$.

In assay 2, virus accumulation was measured at each evaluation date by molecular hybridization, as described in Pérez-de-Castro et al. (2013). In brief, DNA was isolated and 2.5 μL of each sample and a 10-fold dilution were denatured and blotted on to nylon membranes. The probe (supplied by E.R. Bejarano, Universidad de Málaga, Spain) contained the intergenic region of the TYLCV-Mld[ES:72:97] isolate and was digoxigenin-labelled by PCR. Hybridization was carried out following manufacturer's instructions (Roche Molecular Biochemicals). Detection was carried out with CSPD by exposure to a CCD camera for approx. 1 h (Intelligent Dark BoxII, Fujifilm, Tokyo, Japan). Quantification of viral ssDNA was achieved by comparison with a standard curve of TYLCV dotted on the same membrane (ranging from 10 ng to 1 μg). Fluorimetry was used to quantify total plant DNA extracted (Hoefer DyNA Quant 300 fluorometer, according to manufacturer's instructions). Accumulation was expressed as ng of virus DNA μg^{-1} of total DNA isolated.

In assays 5, 6 and 7, virus accumulation was also measured by dot-blot molecular hybridization, as described by Fuentes et al. (2006). In brief, an extract was prepared from five plants of each genotype, and 3 μL of the extract were denatured and blotted on to nylon membranes. The probe contained a fragment of the intergenic region of the TYLCV-IL[CU] isolate and was random prime labelled with α -[^{32}P]-dCTP. Hybridization was conducted as described by Martínez et al. (2001). Detection was carried out by exposure to X-ray films (Kodak, mod. X-Omat AR) for 4 h at -70°C . A standard curve of TYLCV-IL [CU] (ranging from 10 ng μL^{-1} to 0.01 ng μL^{-1}) was used to visually estimate the concentration of viral DNA in each sample.

RESULTS

Assays 1 and 2

These two assays carried out in Spain with the same experimental conditions, differed only for the season in which the evaluation was carried out: assay 1 was during spring-summer and assay 2 during autumn-winter. The rate of symptom development was affected by the different seasons, as this factor was statistically significant at the 15, 25 and 35 dpi assessments (Table 2). The interaction genotype \times season was only significant

at 15 dpi. Symptom scores were higher in assay 2 at 15 dpi for the two most susceptible genotypes ('FC' and 'STY-1'), while they were similar in both seasons for the remaining genotypes (Figure 1a). Symptom scores tended to be higher in assay 2 for the first three evaluation dates. However, no significant differences were found at 45 and 55 dpi. The effect of the genotype was highly significant for all assessment periods. Variability among different plants of the same line was found for the most susceptible genotypes in both seasons, especially at the initial assessments. Symptom scores increased with assessment period for most of the genotypes. However, some genotypes such as 'STY-3' showed maximum symptom expression at early assessments but displayed subsequent recovery in both seasons (Figure 1a).

Table 2. P-values from ANOVA tests of the effects of experimental factors and their interactions, on symptom scores at the different evaluation dates, in assays 1-2 and 3-4.

Assays 1-2	15 dpi	25 dpi	35 dpi	45 dpi	55 dpi
Genotype	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Season	<0.0001	0.0077	0.0201	NS	NS
Interaction	<0.0001	NS	NS	NS	NS
Assays 3-4	15 dpi	25 dpi	35 dpi	45 dpi	55 dpi
Genotype	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Plant age	0.0135	0.5990	0.4252	NS	<0.0001
Interaction	0.0347	<0.0001	0.0027	NS	0.0063

Symptom scores tended to be higher in assay 2 for the first three evaluation dates. However, no significant differences were found at 45 and 55 dpi. The effect of the genotype was highly significant for all assessment periods. Variability among different plants of the same line was found for the most susceptible genotypes in both seasons, especially at the initial assessments. Symptom scores increased with assessment period for most of the genotypes. However, some genotypes such as 'STY-3' showed maximum symptom expression at early assessments but displayed subsequent recovery in both seasons (Figure 1a). Moreover, as previously stated, symptom intensification was delayed in assay 1 when compared to the assay 2, especially for the subgroup of susceptible genotypes. The final assessment date (i.e. 55 dpi, Figure 1a) was selected to classify the response to infection of each STY line. Three groups could be established, which displayed some consistency across seasons. The first group included only line 'STY-1'.

This genotype was classified as susceptible. The response was similar to that found in line 'FC', which is the susceptible control routinely used in our inoculation assays. The second group included lines with intermediate levels of resistance. The lines 'STY-2' and 'STY-4' were classified within this group in both seasons, as they differed significantly from 'TY-1' and from lines with the highest levels of resistance. The highly resistant group comprised the lines 'STY-3', 'STY-6', and 'STY-7' in both assays. The line 'STY-5' showed instable disease reaction, being resistant in the autumn-winter assay, but of intermediate resistance in the spring-summer assay.

Virus accumulation was measured in the autumn-winter assay (assay 2). The differences among genotypes were clearer from 35 dpi than earlier, corresponding to higher virus accumulation (Figure 2). The highest values were detected at 55 dpi for most of the genotypes. At this date, virus accumulation in line 'STY-1' was higher than for the rest of the STY lines and comparable to the levels found in the susceptible control 'FC'. 'STY-1' was the only STY line classified as susceptible in our conditions according to symptom scores. Virus accumulation in 'STY-2' and 'STY-4' (intermediate resistance) was slightly higher than in 'STY-3', 'STY-5', 'STY-6', or 'STY-7' (classified as highly resistant). Considering all plants of the STY lines included in the assay, there was a moderate positive correlation, although highly significant, between symptom development and virus accumulation for each sampling date: values for correlation were 0.37 (P=0.0015) for 15 dpi, 0.38 (P=0.0012) for 25 dpi, 0.39 (P=0.0009) for 35 dpi, 0.37 (P=0.0015) for 45 dpi and 0.55 (P<0.0001) for 55 dpi.

Assays 3 and 4

Assays 3 and 4 were carried out simultaneously in the same season (spring-summer 2012). The inoculation conditions for both assays were the same, except for the age of the plants: inoculation was done at 14 days after sowing (das) in assay 3 and 28 days in assay 4.

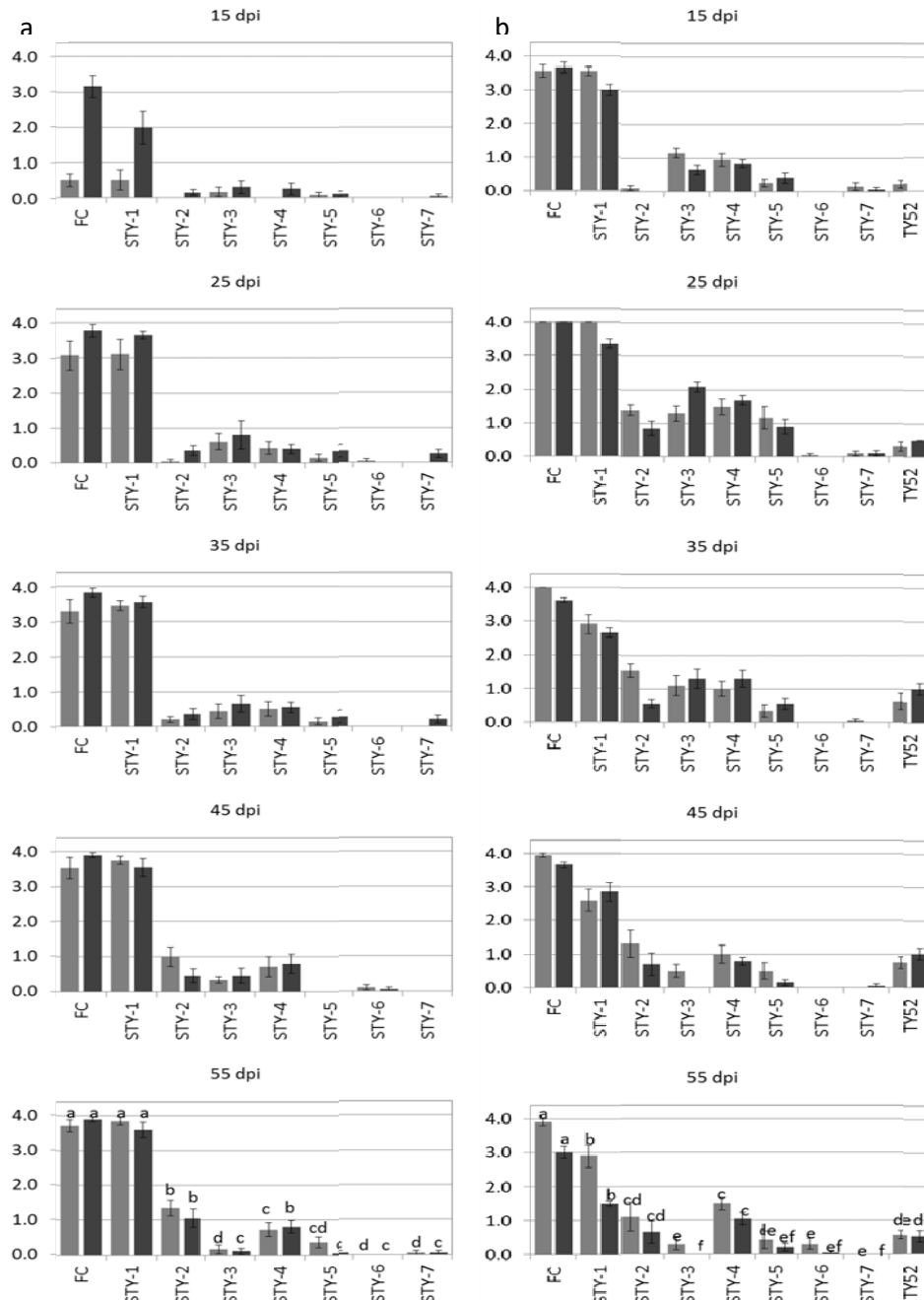


Figure 1. Average symptom score (\pm standard error) at each evaluation date (dpi: days post inoculation). Symptom scores were evaluated using a scale from 0 (symptomless) to 4 (severe symptoms). At 55 dpi, different letters for genotypes in the same assay indicate statistically significant differences (LSD, $P < 0.05$). a) Assays 1 (light grey) and 2 (dark grey): STY lines and the susceptible control ‘Fortuna C’ (FC). b) Assays 3 (light grey) and 4 (dark grey): STY lines, the susceptible control ‘Fortuna C’ (FC) and the resistant control ‘TY52’.

The interaction of genotype \times age for symptom development was statistically significant, except at 45 dpi (Table 2). The effect of age was significant at 15 and 55 dpi, with higher average symptom scores in plants of inoculated at 14 das. The genotype effect was highly significant for all disease assessments. Results in these assays were similar to

those from assays 1 and 2 with respect to variability of the reaction to TYLCV among plants of the same line. Symptom development was earlier in assays 3 and 4 than in assays 1 and 2 (Figure 1b), but at the final assessment date (55 dpi) symptom scores were similar or even lower than in assays 1 and 2. In assays 3 and 4, for most of the genotypes, the maximum average symptom score occurred at 25 or 35 dpi, with a subsequent recovery of some of the plants at later assessments. Differences in symptom scores between plants inoculated at 14 and 28 days were significant for some of the genotypes. At 55 dpi, symptom scores were significantly higher in the most susceptible genotypes ('FC' and 'STY-1') for plants inoculated at younger development stages than those inoculated later. The susceptibility groups established in assays 1 and 2 were well conserved in assays 3 and 4. 'STY-1' was the line with highest symptom scores. However, considering symptom scores at 55 dpi in the assay conducted with plants inoculated at 28 das, the line 'STY-1' was classified as resistant (average symptom score = 1.5). Scores were higher at earlier assessment dates, but some plants recovered later. In any case, in assays 3 and 4, symptoms were more severe in the line 'FC' (the susceptible control routinely used by us), which was classified as susceptible. The lines 'STY-2' and 'STY-4' were included in the intermediate resistance group in assays 1 and 2. Both lines did not differ in assays 3 and 4, but differed significantly from 'STY-1'. The difference with respect to the previous assays was that 'STY-2' did not differ from some of the lines in the resistant group in assay 3. This group comprised lines 'STY-3', 'STY-5', 'STY-6', and 'STY-7'.

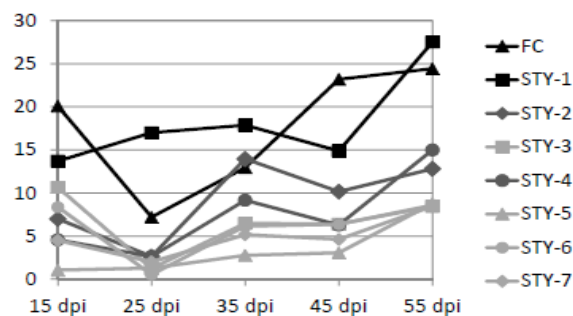


Figure 2. Virus accumulation (ng virus DNA/ μ g total DNA extracted) in assay 2 at different days post-inoculation (dpi) with *Tomato yellow leaf curl virus* of the STY lines and the susceptible control 'Fortuna C' (FC). Genotypes are classified according to symptom development: susceptible genotypes in black, intermediate resistance in dark grey and highly resistant in light grey.

The resistant control 'TY52' showed lower level of resistance than lines 'STY-6' and 'STY-7' when inoculated at 28 das, and was not significantly different from 'STY-2', classified as intermediate resistant.

Assays 5 and 6

Assays 5 and 6 were carried out in Cuba, each employing the same experimental conditions and differing only for the season of the evaluation: assay 5 was carried out in the spring-summer season and assay 6 in autumn-winter. Effects of the season, genotype, and the season \times genotype interaction were significant for all evaluation dates. At 15 dpi, symptom scores were higher in spring-summer for the most susceptible genotypes, while for most of the other genotypes higher scores were observed in the autumn-winter assay. (Figure 3a). Variability was observed at 30 and 45 dpi. The symptom scores were similar in both seasons for some of the genotypes, although important differences occurred for others, such as ‘STY-7’.

Variability in severity scores was low among plants of the same line in both assays. Symptoms scores either increased with date or were stabilized from 15 or 30 dpi for most of the genotypes. The line ‘STY-5’ was an exception, as recovery was observed in assay 6 (Figure 3a). The STY lines were classified according to the symptom scores at 45 dpi. The lines ‘STY-1’ and ‘STY-2’ were classified as susceptible in both assays, although symptom scores were significantly lower for ‘STY-2’, especially in the autumn-winter assay. ‘STY-1’ was comparable to the susceptible control ‘Campbell 28’. The line ‘STY-7’ also displayed a susceptible reaction in the spring-summer assay. The rest of the lines were classified as resistant in this assay, divided in two subgroups: the line ‘STY-3’ and ‘STY-6’ showed intermediate resistance, while ‘STY-4’ and ‘STY-5’ showed higher levels of resistance, similar to the resistant control ‘TY52’. In the autumn-winter assay, the line ‘STY-7’ was among the resistant lines. Symptom scores among all the resistant lines in this assay were equal to 1, except for ‘STY-5’, that showed the highest level of resistance.

Virus accumulation was measured for each line at the three sampling dates in both seasons. The maximum accumulation was detected in the susceptible control ‘Campbell 28’ and the lines ‘STY-1’ and ‘STY-2’; however, there was no clear relationship between symptom scores and virus load for the rest of the genotypes.

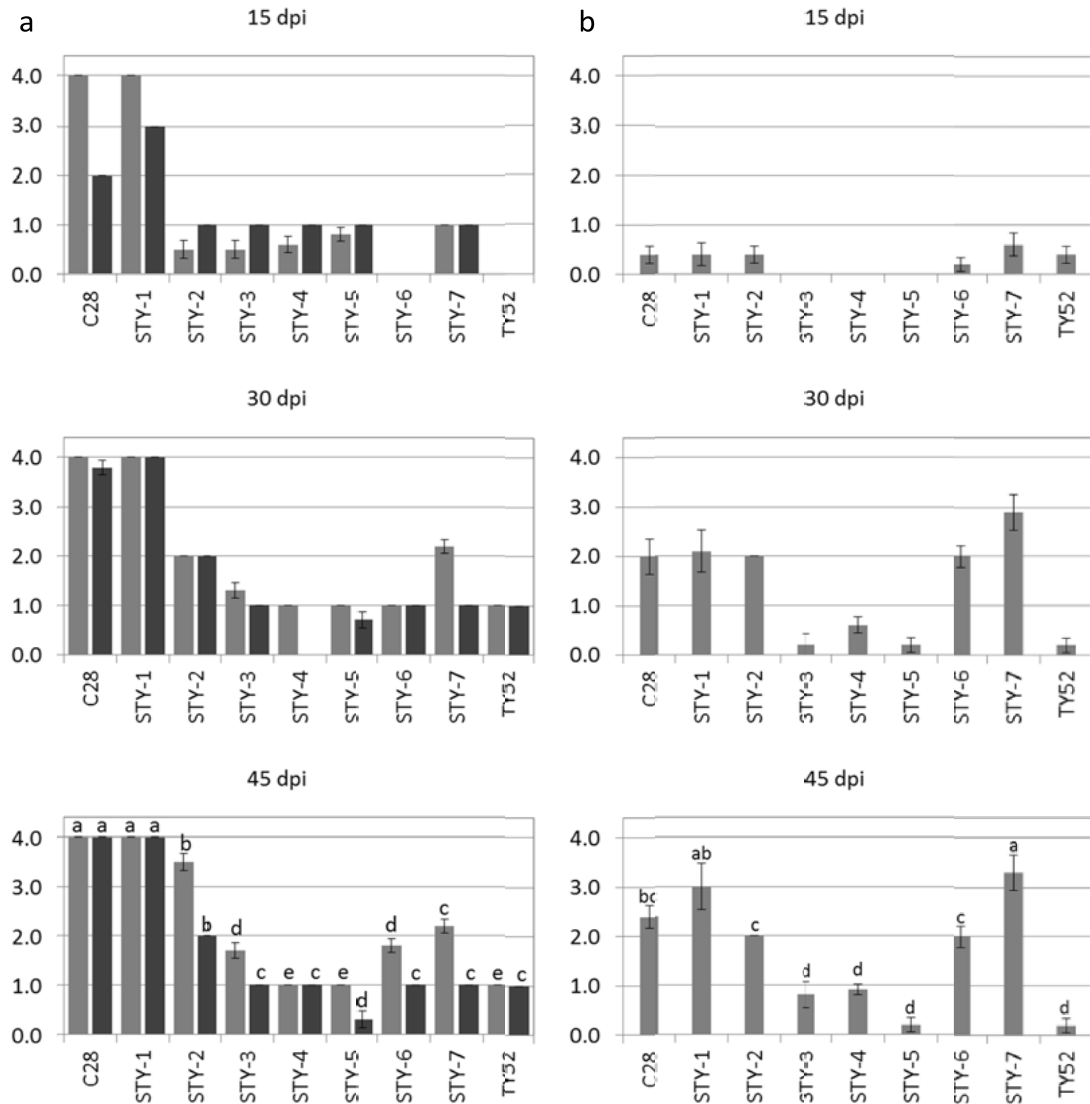


Figure 3. Average symptom score (\pm standard error) at each evaluation date (dpi: days post inoculation) in the STY lines, the susceptible control ‘Campbell 28’ (C28) and the resistant control ‘TY52’. Symptom scores were evaluated using a scale from 0 (symptomless) to 4 (severe symptoms). At 45 dpi, different letters for genotypes in the same assay indicate statistically significant differences (LSD, $P < 0.05$). A) Assays 5 (light grey) and 6 (dark grey). B) Assay 7.

Assay 7

This assay used the agroinoculation method. An overall delay in symptom development in this assay was observed when compared to the whitefly-mediated inoculation assays (Figure 3b). At 15 dpi, average symptom score was below 1 for all the lines and the controls. Some of the genotypes reached the highest score at 30 dpi and this was maintained until 45 dpi. For the rest of the genotypes, the highest symptom score occurred at the final evaluation date. The line ‘TY52’ was the only exception: some of the plants scored 1 at 15 dpi and remained symptomless later. Response of some of the

genotypes differed from the previous assays. The susceptible control ‘Campbell 28’, ‘STY-1’ and ‘STY-2’ were classified as susceptible. In the case of ‘Campbell 28’ and ‘STY-1’, symptom scores were markedly lower than in assays 5 and 6. The lines ‘STY-6’ and ‘STY-7’ were classified as susceptible after agroinoculation. Symptom score for ‘STY-7’ was not significantly different from that of ‘STY-1’. The three remaining lines (‘STY-3’, ‘STY-4’, and ‘STY-5’) were classified as highly resistant. Average symptom scores in these lines were in all cases below 1 and comparable to the resistant control ‘TY52’. No clear relationship was observed between symptom scores and viral accumulation

DISCUSSION

This study has evaluated the scale developed by Lapidot et al. (2006), to check its applicability in a diverse range of experimental conditions, in seven assays conducted in two geographic locations (Cuba and Spain), with different TYLCV isolates, inoculation methods, plant ages, and environmental conditions.

The results obtained were not comparable to those described by Lapidot et al. (2006), probably due to differences in the inoculation methods and to environmental influences in the level of host resistance. In addition, the viral isolates used were not the same. In the first place, the overall symptom scores were generally lower in the conditions assayed in both locations with respect to the results described by Lapidot et al. (2006). The results obtained did not correspond to a scale of graded levels of resistance; instead, it was only possible to establish three reaction groups of susceptible, intermediate resistant and highly resistant among the standard and control genotypes. For most of the conditions (assay 5 was the only exception), large differences were observed among the susceptible and the resistant lines, while the range for the symptom scores in the two resistant groups was narrow. Therefore, the possibility for establishing a reliable gradation of the levels of susceptibility and resistance in the plant material evaluated together with the standard lines was reduced with respect to the original purpose of the scale (Lapidot et al., 2006). Similar results were found when the STY scale was tested with the Australian TYLCV-IL[Au:Bri3:06] isolate using whitefly-mediated inoculation in cages. Similarly, the observed symptom scores were lower for each line compared with results reported by Lapidot et al. (2006), and a clear-cut grade scale was not obtained

(Van Brunschot, 2010). Regarding the ranking order of the lines in the scale, coincidence with the original description was higher in the assays carried out in Spain. Symptom scores in the 'STY-1' line were higher than in the other lines in assays 1 to 4. Lines 'STY-2' and 'STY-4' followed 'STY-1', although their order varied depending on the experimental conditions. 'STY-3' showed lower scores than expected, especially in assays 3 and 4. 'STY-3' was the only line for which the order was affected by the different conditions evaluated by Lapidot et al. (2006); moreover, the TYLCV-induced yield reduction in this line was lower than expected according to symptom severity. 'STY-3' was derived from a semideterminate hybrid, while 'STY-2', 'STY-4', 'STY-5', and 'STY-6' were derived from determinate hybrids. The difference in vegetative vigour may explain the high level of resistance observed in the line 'STY-3' in conditions more similar to those occurring in normal tomato production systems, such as those of used in assay 4 (with plants being inoculated later than in other assays).

The ranking order of lines 'STY-5', 'STY-6', and 'STY-7' was quite conserved in the Spanish assays. However, the results in the assays carried out in Cuba differed. The ranking order of the lines 'STY-1' to 'STY-5' was almost maintained with respect to the original scale. However, the lines 'STY-6' and 'STY-7' were not as resistant as in the experimental conditions reported by Lapidot et al. (2006). These lines showed variable responses depending on the season and the inoculation method. When the inoculation was carried out with whiteflies, the season was an important factor determining the host reactions. In assay 5, with warm temperatures, both lines showed symptom scores close to 2, with 'STY-7' being classified as susceptible, while in assay 6 both lines were scored with grade 1. Moreover, in assay 7, warm temperatures combined with agroinoculation intensified symptoms in 'STY-7' compared to assays 5 and 6.

Lines 'STY-2' to 'STY-5' are derived from resistant hybrids developed by different seed companies (Lapidot et al., 2006). According to the results obtained in these assays, resistance in these host lines is effective against different isolates of TYLCV and under different inoculation and environmental conditions. Among the resistance sources for these four lines, the hybrid Tyking (source of the line 'STY-5') is the most studied (Giordano et al., 2005; Garcia-Cano et al., 2008; Hutton et al., 2012; Pereira-Carvalho et al., 2015). The resistance to TYLCV in 'Tyking' is conferred by the recessive gene *ty-5* (Hutton et al., 2012). This hybrid has been used worldwide, providing high levels of resistance in breeding programmes against different begomoviruses (Pereira-Carvalho et

al., 2010; 2015; Hutton et al., 2012). In the conditions employed here, ‘STY-5’ also showed high levels of resistance, with low symptom scores and low virus accumulation as previously reported (Pereira-Carvalho et al., 2015). This was not the case for the lines ‘STY-6’ and ‘STY-7’. These lines are derived from the breeding lines ‘TY197’ and ‘TY172’, respectively, which incorporate resistance from *S. peruvianum* (Lapidot et al., 1997; Friedmann et al., 1998). High levels of resistance to TYLCV have been reported in ‘TY197’ and ‘TY172’ by other authors using different inoculation techniques (including agroinoculation), different isolates and different conditions (Pérez de Castro et al., 2005; Anbinder et al., 2009), even against Cuban isolates of TYLCV (Dueñas et al., 2008; Piñón, 2009). Moreover, these two lines have showed good levels of resistance against other begomoviruses (Santana et al., 2001; Mejía et al., 2005; Bian et al., 2007). However, contradictory results have been obtained in some cases. For example, Bian et al. (2007) reported ‘TY172’ with symptoms scores of 2 at 30 days after agroinoculation. According to the results obtained in the present work, resistance in these lines can be partially overcome by the Cuban TYLCV isolate, especially under high temperature conditions. Moreover, in the case of ‘STY-7’, agroinoculation intensified the manifestation of the viral symptoms.

Evolution of symptoms varied depending on the experimental conditions and the tomato lines. Differences were found when comparing similar inoculation conditions in different seasons. In assays 1 and 2, there was a clear delay in symptom appearance in the assay carried out in the spring-summer season with respect to the autumn-winter assay. Temperatures at the inoculation time could be a possible explanation: higher temperatures in assay 2 produced a rapid progression in symptom development when compared to the assay 1.

In all cases, disease symptoms increased with sampling dates, and the classification of the genotypes at the final sampling date (55 dpi) was not affected by differences in symptom development. Assays 5 and 6 were also conducted with the same inoculation conditions but in different seasons. In this case, temperatures were lower at the beginning of the assay carried out during the autumn-winter season (assay 6, the most appropriate season for tomato cultivation in Cuba), which could explain the delay in symptom evolution in the most susceptible genotypes, compared with the assay during the spring-summer season. Unlike the results from assays 1 and 2, differences were found regarding classification of the genotypes in assays 5 and 6. The different conditions led

to the classification of line 'STY-7' as susceptible under high temperature conditions (assay 5) and resistant in the autumn-winter season (assay 6). Other studies have reported differences in symptom development after inoculation with TYLCV related to differences in temperature, with higher symptom scores being reported under higher temperatures (Lapidot et al., 2006; García-Cano et al., 2008).

The effect of plant age at inoculation was also studied in assays 3 and 4. Symptom scores were lower for some of the genotypes, especially the susceptible lines, when older plants were inoculated. Lapidot et al. (2006) validated the scale inoculating 10 and 21 days old plants, and their results were slightly different. Symptom scores also tended to be lower in plants inoculated later, but they found no differences in the most susceptible genotype, 'STY-1', while differences were higher than in our assays for some of the other genotypes. Levy and Lapidot (2008) reported no effect of plant age on symptom scores in the susceptible genotypes, and only minor effects on resistant varieties, when using whitefly-mediated TYLCV inoculation on plants at 14, 28 and 45 days.

Discrepancies among the different assays can be due to differences in the environmental conditions and/or the virus isolates used. In the assays 3 and 4 there was a recovery in symptom expression for later evaluation dates for most of the genotypes. This recovery was especially important in susceptible lines when inoculated 28 das. The line 'STY-1' was classified as resistant at the end of the assay 4 (inoculation 28 das). This was probably a consequence of the more advance developmental stage (older plants) during the inoculation procedure. Reduction in viral accumulation, and in yield losses, in plants inoculated at an older stage has also been related to the developmental stage and the higher vegetative vigour of these plants. Levy and Lapidot (2008) discussed the best time to inoculate tomato plants when evaluating resistance to TYLCV. Their proposal was to inoculate at early stages in screening assays aiming to select plants with the highest levels of resistance. However, in trials to evaluate resistance in commercial tomato lines, they recommended inoculation at later stages (approx. 28 das), to represent the commercial situation, where nurseries are well protected against the disease and infection occurs mainly after transplanting.

The results obtained in the work presented here provide useful information about the effects of different experimental conditions on the results obtained using the Lapidot et al. (2006) scale for evaluation of tomato reaction to TYLCV. In the first place, the fact that response obtained in the conditions assayed here do not correspond to the original

grade scale, suggests the possibility of reducing the number of standard lines used. Our recommendation is to select the two genotypes with extreme responses (the most susceptible and the most resistant), as well as a line with intermediate resistance. Moreover, some genotypes with resistance derived from distinct genetic sources could be incorporated, to provide clear representation of the distinct levels of resistant responses. As an example, in the conditions assayed in Spain, ‘STY-1’ could be the susceptible control, ‘STY-4’ the standard line for intermediate resistance, and ‘STY-7’ could be the resistant control. To increase the discrimination capacity, it would be advisable to incorporate more lines with lower resistance, such as the ones derived from the wild species *S. pimpinellifolium* (Pérez de Castro et al., 2007). Besides that, the variability in symptom evolution, depending on the line and on the season, highlights the importance of a standardised inoculation method and appropriate selection of criteria for the evaluation of the resistance. This will ensure that the experimental conditions and the evaluation period will provide more consistent genotype responses.

Acknowledgments

This paper is dedicated to the memory Olga Julián, who passed away in January 27th, 2015, and whose premature death left a deep sense of loss among her friends and colleagues.

LITERATURE CITED

- 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* 119:519-530
- Bian XY, Thomas MR, Rasheed MS, Saeed M, Hanson P, De Barro PJ, Rezaian MA (2007) A recessive locus (*tgr-1*) conditioning tomato resistance to multiple geminiviruses is associated with impaired viral movement. *Phytopathology* 97:930-937
- Caro M, Verlaan MG, Julián O, Finkers R, Wolters AMA, Hutton SF, Scott JW, Kormelink R, Visser RGF, Diez MJ, Pérez-de-Castro A, Bai Y (2015) Assessing the

genetic variation of *Ty-1* and *Ty-3* alleles conferring resistance to tomato yellow leaf curl virus in a broad tomato germplasm. *Molecular Breeding* 35:132

Dueñas F, Martínez Y, Álvarez M, Moya C, Peteira B, Arias Y, Díez MJ, Hanson P, Shagarodsky T (2008) Caracterización agromorfológica y evaluación de la resistencia al TYLCV en nuevos genotipos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) como apoyo al programa de mejoramiento genético de la hortaliza para la enfermedad. *Cultivos Tropicales* 29:53-60

Fargette D, Leslie M, Harrison BD (1996) Serological studies on the accumulation and localization of three tomato leaf curl geminiviruses in resistant and susceptible *Lycopersicon* species and tomato cultivars. *Annals of Applied Biology* 128:317-328

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* 123:1004-1007

Fuentes A, Ramos PL, Fiallo E, Callard D, Sánchez Y, Peral R, Rodríguez R, Pujol M (2006) Intron-hairpin RNA derived from replication associated protein C1 gene confers immunity to *Tomato yellow leaf curl virus* infection in transgenic tomato plants. *Transgenic Research* 15:291-304

García-Cano E, Resende RO, Boiteux LS, Giordano LB, Fernández R, Moriones E (2008) Phenotypic expression, stability, and inheritance of a recessive resistance to monopartite begomoviruses associated with tomato yellow leaf curl disease in tomato. *Phytopathology* 98:618-627

Giordano LB, Silva-Lobo VL, Santana FM, Fonseca MEN, Boiteux LS (2005) Inheritance of resistance to the bipartite *Tomato chlorotic mottle begomovirus* derived from *Lycopersicon esculentum* cv. 'Tyking'. *Euphytica* 143:27-33

Hanssen IM, Lapidot M, Thomma BOHJ (2010) Emerging viral diseases of tomato crops. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23:539-548

Hassan AA, Mazyad HM, Moustafa SE, Nassar SH, Nakhla MK, Sims WL (1984) Inheritance of resistance to Tomato yellow leaf curl virus derived from *Lycopersicon cheesmanii* and *Lycopersicon hirsutum*. *HortScience* 19:574-575

- Hutton SF, Scott JW, Schuster DJ (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* 47:324-327
- Kasrawi MA (1989) Inheritance of resistance to Tomato yellow leaf curl virus in *Lycopersicon pimpinellifolium*. *Plant Disease* 73:435-437
- Kasrawi MA, Mansour A (1994) Genetics of resistance to Tomato yellow leaf curl virus in tomato. *Journal of Horticultural Science* 69:1095-1100
- King AM, Adams MJ, Lefkowitz EJ (2011) Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, San Diego, USA, p. 1327
- Lapidot M, Friedmann M (2002) Breeding for resistance to whitefly-transmitted geminiviruses. *Annals of Applied Biology* 140:109-127
- Lapidot M, Friedmann M, Lachman O, Yehezkel A, Nahom S, Cohen S, Pilowsky M (1997) Comparison of resistance level to Tomato yellow leaf curl virus among commercial cultivars and breeding lines. *Plant Disease* 81:1425-1428
- Lapidot M, Golray O, Ben-Joseph R, Cohen S, Friedmann M, Sholmo A, Nahon S, Chen L, Pilowsky M (2000) Breeding tomatoes for resistance to Tomato yellow leaf curl begomovirus. *EPPO Bulletin* 30:317-321
- Lapidot M, Ben-Joseph R, Cohen L, Machbash Z, Levy D (2006) Development of a scale for evaluation of *Tomato yellow leaf curl virus* resistance level in tomato. *Phytopathology* 96:1404-1408
- Levy D, Lapidot M (2008) Effect of plant age at inoculation on expression of genetic resistance to tomato yellow leaf curl virus. *Archives of Virology* 153:171-179
- Martínez Y, Fonseca D, Quiñones M, Peralta EL (2001) Evaluación de parámetros analíticos para la detección molecular de geminivirus que afectan el cultivo del tomate en Cuba. *Protección Vegetal* 16:55-61
- Mejía L, Teni RE, Vidavsky F, Czosnek H, Lapidot M, Nakhla MK, Maxwell DP (2005) Evaluation of tomato germplasm and selection of breeding lines for resistance to begomoviruses in Guatemala. *Acta Horticulturae* 695:251-255

- Michelson I, Zamir D, Czosnek H (1994) Accumulation and translocation of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in a *Lycopersicon esculentum* breeding line containing the *L. chilense* TYLCV tolerance gene *Ty-1*. *Phytopathology* 84:928-933
- Pereira-Carvalho RC, Boiteux LS, Fonseca MEN, Díaz-Pendón JA, Moriones E, Fernández-Muñoz R, Charchar JM, Resende RO (2010) Multiple resistance to *Meloidogyne* spp. and to bipartite and monopartite *Begomovirus* spp. in wild *Solanum (Lycopersicon)* accessions. *Plant Disease* 94:179-185
- Pereira-Carvalho RC, Díaz-Pendón JA, Fonseca MEN, Boiteux LS, Fernández-Muñoz R, Moriones E, Resende RO (2015) Recessive resistance derived from tomato cv. Tyking limits drastically the spread of *Tomato yellow leaf curl virus*. *Viruses* 7: 2518-2533
- Pérez de Castro A, Díez MJ, Nuez F (2005) Evaluation of breeding tomato lines partially resistant to *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* derived from *Lycopersicon chilense*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 27:268-275
- Pérez de Castro A, Díez MJ, Nuez F (2007) Inheritance of Tomato yellow leaf curl virus resistance derived from *Solanum pimpinellifolium* UPV16991. *Plant Disease* 91:879-885
- Pérez de Castro A, Julián O, Díez MJ (2013) Genetic control and mapping of *Solanum chilense* LA1932, LA1960 and LA1971-derived resistance to Tomato yellow leaf curl disease. *Euphytica* 190:203-214
- Picó B, Díez MJ, Nuez F (1998) Evaluation of whitefly-mediated inoculation techniques to screen *Lycopersicon esculentum* and wild relatives for resistance to Tomato yellow leaf curl virus. *Euphytica* 101:259-271
- Pilowsky M, Cohen S (1990) Tolerance to *Tomato yellow leaf curl virus* derived from *L. peruvianum*. *Plant Disease* 74:248-250
- Piñón M (2009) Obtención de líneas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) resistentes al virus del encrespamiento amarillo de la hoja del tomate (TYLCV) en Cuba, (PhD Thesis), Instituto de Investigaciones Hortícolas Liliana Dimitrova (IIHLD), p.126

- Santana FM, Ribeiro SG, Moita AW, Moreira DJ, Giordano LB (2001) Sources of resistance in *Lycopersicon* spp. to a bipartite whitefly-transmitted geminivirus from Brazil. *Euphytica* 122:45-51
- Van Brunshot SL, Persley DM, Geering ADW, Campbell PR, Thomas JE (2010) Tomato yellow leaf curl virus in Australia: distribution, detection and discovery of naturally occurring defective DNA molecules. *Australasian Plant Pathology* 29:412-423
- Zakay Y, Navot N, Zeidan M, Kedar N, Rabinowitch H, Czosnek H, Zamir D (1991) Screening *Lycopersicon* accessions for resistance to tomato yellow leaf curl virus: Presence of viral DNA and symptom development. *Plant Disease* 75:279-281

DISCUSIÓN GENERAL

Obtención de generaciones avanzadas a partir de *Solanum peruvianum* PI 126944 en el fondo genético de *Solanum lycopersicum* mediante el cultivo de semillas inmaduras

Uno de los objetivos principales en la mejora del tomate es la mejora para resistencias a enfermedades. El tomate es atacado por numeroso patógenos que causan importantes pérdidas económicas en todos los lugares de cultivo. Desde la consecución de los primeros híbridos interespecíficos, inicialmente con la especie más próxima, *Solanum pimpinellifolium* (Stevens y Rick, 1986), y más tarde con otras de más difícil cruzamiento como *Solanum peruvianum* (Smith, 1944), la mejora para resistencia a enfermedades se ha orientado hacia la búsqueda de genes de resistencia en las especies silvestres relacionadas con el tomate. Ello ha sido motivado por la estrecha base genética del tomate ocasionada por los procesos de domesticación (Miller y Tanksley, 1990; Blanca et al., 2012). Sin embargo, la utilización de germoplasma silvestre se ha visto limitada por la existencia de barreras de cruzabilidad entre las especies silvestres y la cultivada (Grandillo et al., 2013). De las 13 especies incluidas en la sección *Lycopersicon*, *Solanum chilense*, *Solanum corneliomuelleri*, *Solanum huaylasense*, *Solanum arcanum* y *Solanum peruvianum* son las que presentan las barreras más importantes. Para conseguir híbridos interespecíficos con estas especies es necesario recurrir a técnicas como los cruces puente, la aplicación de distintos compuestos químicos en el estigma o el rescate de los embriones inmaduros y su cultivo in vitro con medios adecuados para permitir el desarrollo del embrión en estadios muy tempranos (Smith, 1944; Kalloo, 1991).

En ensayos previos no incluidos en esta Tesis, se identificó resistencia al virus del rizado amarillo del tomate (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) y al virus del bronceado del tomate (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) en la entrada PI 126944 de *S. peruvianum* (Picó et al., 1998; Roselló et al., 1999). La elevada incompatibilidad entre esta entrada y el tomate cultivado fue evidente al obtener los primeros híbridos interespecíficos, siendo necesario recurrir a la combinación de tratamientos del estigma y pistilo con el posterior cultivo de semillas inmaduras (Picó et al., 2002). La obtención de retrocruzamientos entre los híbridos interespecíficos y el tomate resultó igualmente difícil, obteniendo un limitado número de plantas. En el transcurso de la obtención de estas generaciones se probaron los materiales por su resistencia a ambos virus, demostrado la introgresión con éxito de la misma (Julián et al., 2013). Sin embargo, mientras que la resistencia a TSWV pareció ser de control monogénico, la resistencia a TYLCV tuvo un comportamiento más complejo, sugiriendo la implicación de un mayor

número de genes en su control genético. Por ello, se planteó la construcción de una población de líneas de introgresión que facilitara la localización de los genes implicados en la resistencia. Para tener totalmente representado el genotipo de la especie donante en el fondo genético de la especie receptora es necesario obtener un gran número de descendientes. Por ello, el primer objetivo de esta Tesis consistió en estudiar distintos factores implicados en la superación de las barreras de incompatibilidad, con objeto de conseguir un elevado número de descendientes y maximizar la probabilidad de introgresar todo el fondo genético de la entrada donante PI 126944 en la población de líneas de introgresión. Los factores estudiados fueron el medio de cultivo, el número de días transcurridos desde la polinización hasta la recolección de los frutos, los parentales utilizados, la selección de semillas inmaduras rescatadas y el método de cultivo de las mismas, para lo cual se realizaron tres ensayos.

Con el objeto de introgresar todo el genotipo del parental donante, en el primero de los ensayos se utilizó el máximo número de plantas obtenidas en los cruzamientos anteriores, mientras que en el segundo y tercer ensayos se utilizaron plantas obtenidas en el primer ensayo. Esto sirvió para conocer que el genotipo de estas plantas es un factor determinante en la obtención de descendencia y de la fertilidad de la misma. Mientras que con una de las plantas correspondiente al conjunto de generaciones menos avanzadas se obtuvo un rendimiento del 2% ((número de plantas obtenidas/número de semillas sembradas)*100), otras no dieron lugar a descendencia viable. Esto ocurrió tanto en los parentales pertenecientes a las generaciones pseudo- F_n (primer ensayo) como a la pseudo- F_nBC_1 (segundo ensayo), aunque en este último caso el número de parentales sin descendencia fue mucho menor. Esta diferencia en la incompatibilidad con el tomate cultivado viene probablemente determinada por el distinto genotipo de cada planta utilizada como parental masculino. La elección del parental masculino a cruzar es un factor incontrolable para el mejorador, por lo que la única opción para maximizar la probabilidad de obtener descendencia es utilizar en cada ciclo de retrocruzamiento el máximo número de plantas posible. Por otra parte, el rendimiento aumentó considerablemente al comparar en conjunto los parentales de las generaciones pseudo- F_n (rendimiento = 0,6%), pseudo- F_nBC_1 (4%) y pseudo- F_nBC_2 (30%), demostrando la superación de las barreras de incompatibilidad a medida que se avanza en la obtención de retrocruces. El rendimiento del primer retrocruce (cruces realizados con parentales masculinos de la generación F_n) fue marcadamente bajo, coincidiendo con el obtenido por diversos autores (Imanishi, 1988; Encina et al., 2012). Inferior fue el resultado

obtenido por Cap et al. (1993), ya que no pudieron obtener ningún descendiente. Sin embargo, Doganlar et al. (1997) obtuvieron resultados mucho más eficientes. Estas diferencias son esperables y atribuibles tanto al material vegetal (parentales donantes y receptores), como a las variables de los métodos empleados en cada caso.

La prueba de diferentes medios de cultivo contribuyó a la optimización y selección del medio más adecuado para el cultivo de semillas inmaduras y posterior regeneración de plantas. La composición de los medios tiene una fuerte influencia en el tipo de respuesta obtenida, organogénica o embriogénica, y en el éxito del rescate de embriones inmaduros o del cultivo de semillas inmaduras. En la mayoría de los casos los medios empleados por los distintos autores utilizan combinaciones de auxinas y citoquininas que favorecen la producción de callos (Thomas y Pratt, 1981; Cap et al., 1991; Segeren et al., 1993; Julián et al., 2013). Sin embargo, no todas las combinaciones de ambos reguladores de crecimiento dan lugar a la misma eficiencia. En nuestro caso, la combinación de diferentes auxinas y citoquininas dio lugar a resultados distintos. La adición de ácido 2,4-diclorofenoxiacético con 6-bencilaminopurina al medio dio lugar a la ausencia de regeneración de plantas, ya sea por vía embriogénica u organogénica. Sin embargo, la combinación de zeatina y ácido indolacético permitió incrementar la eficiencia, de forma comparable al medio de cultivo que incluía únicamente zeatina. La determinación de los medios más adecuados en el primero de los ensayos (M2 y M3) resultó fundamental para la obtención de numerosos descendientes, tanto en este ensayo como en los dos posteriores. Por otro lado, la vía de regeneración mayoritaria en el primer ensayo fue la formación de callos, mientras que en el segundo y tercer ensayos la vía predominante fue la germinación directa. Este hecho podría deberse a la menor probabilidad de germinación directa del embrión cuando se cruzan materiales más alejados, como es el caso de las generaciones F_n en el primer ensayo, mientras que en los siguientes ensayos los parentales masculinos utilizados fueron plantas BC_1 . La mayor proximidad genética de estas plantas BC_1 en relación al tomate cultivado genera una relajación de la incompatibilidad sexual entre ambos parentales y facilita el desarrollo del embrión, favoreciendo la germinación directa del mismo.

Los días transcurridos desde la polinización hasta la recolección de los frutos es otro de los parámetros que determinan el éxito en la consecución de plantas a partir del rescate de las semillas inmaduras. Los resultados obtenidos por diversos autores son muy variables, dependiendo claramente de otras variables de cada ensayo en particular (Thomas y Pratt, 1981; Barbano y Topoleski, 1984; Lai et al., 1990; Chen y Adachi, 1992;

Chen y Adachi, 1996; Fulton et al., 1997; da Costa Ribeiro y de Britto Giordano, 2001). En nuestro caso, existe una discrepancia entre los resultados encontrados en el primer ensayo, en el que el rescate a los 35 días después de la polinización dio los mejores resultados, frente a lo obtenido en el resto de ensayos, en los que a los 25 ó 30 las eficiencias fueron mayores. Existen varias diferencias entre el primero y los siguientes ensayos que podrían contribuir a estos resultados, fundamentalmente la generación a la que pertenecen los parentales masculinos, la selección efectuada en las semillas inmaduras para su cultivo in vitro y la realización de una abertura en las semillas antes de su cultivo, con el objeto de facilitar la germinación y desarrollo del embrión. Además, en ningún caso se controló el tamaño preciso de las flores en el momento de la emasculación y polinización. Este hecho se evidenció al observar diferencias en el tamaño de los frutos recolectados tras el mismo número de días después de la polinización. Por todo ello, resulta difícil atribuir únicamente al número de días transcurridos desde la polinización a la recolección de los frutos las diferencias encontradas en los experimentos, siendo necesario, en nuestra opinión, un estudio más preciso controlando los factores comentados.

Las semillas inmaduras de los frutos recolectados a distintas fechas tras la polinización pueden presentar un desarrollo y apariencia variables. Mientras algunas muestran un escaso desarrollo y aparecen semitransparentes y aparentemente vacías, otras son algo mayores con probabilidades de contener un embrión en fases tempranas de desarrollo. La selección de este tipo de semillas para su cultivo fue ya realizada por Imanishi et al. (1985) e Imanishi (1988) con resultados positivos. En nuestro caso, la selección se aplicó en los ensayos segundo y tercero, pudiendo ser uno de los factores que han contribuido a la obtención de un rendimiento mayor. De igual forma, la realización de un corte en la cubierta de las semillas con el objeto de facilitar el desarrollo del embrión tuvo un efecto claramente positivo sobre la eficiencia, según los resultados obtenidos en el tercer experimento. Esta técnica fue utilizada por otros autores con resultados igualmente positivos (Doganlar et al., 1997; Pratta et al., 1999).

Es importante destacar que ha sido posible aclimatar y analizar fenotípicamente 46 plantas F_nBC_1 , 133 plantas F_nBC_2 y 80 plantas F_nBC_3 . En muchos casos se encontraron plantas de crecimiento anormal, que no llegaron a completar de forma satisfactoria su desarrollo vegetativo ni a florecer. Sin embargo, otras muchas o bien fueron fértiles y cuajaron frutos o bien se pudo aprovechar su polen fértil para continuar con las

hibridaciones hacia el tomate cultivado. El material vegetal obtenido supone un importante paso para continuar hacia el avance de la construcción de la colección completa de líneas de introgresión. Con los datos de genotipado, actualmente en curso, será posible conocer en qué porcentaje está representada la especie silvestre en las plantas obtenidas, y en caso de ser necesario, se podrá recurrir a las generaciones anteriores para cubrir aquellas regiones que no estén presentes en estos materiales. Además, ha sido posible obtener semilla de autofecundación de muchas de las plantas aclimatadas. Estas semillas han germinado normalmente, según ensayos posteriores realizados fuera del marco de esta tesis. Por tanto, se puede dar por superada la incompatibilidad entre ambas especies, siendo posible continuar con la construcción de la colección de líneas de introgresión prescindiendo del rescate de embriones.

En conclusión, este trabajo ha contribuido a desarrollar un protocolo para maximizar la eficiencia en la obtención de descendientes entre el tomate cultivado y materiales derivados de *S. peruvianum*. Se ha determinado la combinación más efectiva de auxinas y citoquininas en el medio de cultivo, se ha probado que la selección de las semillas inmaduras con mayor desarrollo y la realización de una abertura en la cubierta de la semilla para favorecer la germinación y desarrollo del embrión, son dos factores que contribuyen a maximizar la eficiencia del proceso. Por otro lado, se recomienda utilizar tantas plantas derivadas de *S. peruvianum* como sea posible en los cruzamientos, ya que el efecto del genotipo es claro y en principio impredecible, a no ser que se disponga de estudios genéticos más precisos. Por último, concluimos que es necesario un estudio más detallado, con mayor control de otros factores del proceso, para determinar el número de días que han de transcurrir entre la polinización y la recolección de los frutos inmaduros para maximizar la eficiencia.

Evaluación en diversas condiciones de una escala de hospedantes diferenciales de tomate frente al virus del rizado amarillo del tomate, *Tomato yellow leaf curl virus*

La enfermedad del rizado amarillo del tomate está causada por un conjunto de especies virales pertenecientes al género *Begomovirus* y provoca severas pérdidas económicas en todas las regiones templadas del planeta donde se cultiva el tomate. Desde su detección en Israel a principios de los años 40 del pasado siglo (Cohen y Antignus, 1994), diversos grupos de investigación en diferentes países han trabajado activamente

en la búsqueda de fuentes de resistencia y en la introgresión de la misma en el tomate cultivado para el desarrollo de cultivares resistentes. En la actualidad diversos genes de resistencia han sido transferidos al tomate y utilizados a gran escala en los híbridos comerciales que se cultivan en amplias regiones. Las especies más prometedoras han sido *S. chilense*, en la que se han identificado los genes *Ty-1* (Zamir et al., 1994), *Ty-3* (Ji et al., 2007), *Ty-4* (Ji et al., 2009) y *Ty-6* (Hutton et al., 2014), *S. peruvianum*, a partir de la cual se desarrollaron los primeros híbridos, que se cultivaron en Israel. El gen *ty-5* fue identificado en la línea TY172, derivada a partir de cuatro entradas de *S. peruvianum* (Anbinder et al., 2009). Sin embargo, estudios recientes sugieren que el origen de este gen de resistencia no se encuentra en *S. peruvianum*, sino en una mutación en la secuencia original de la especie cultivada (Levin et al., 2013). En *S. habrochaites* se localizó el gen *Ty-2* (Yang et al., 2014), que confiere elevados niveles de resistencia y también ha sido ampliamente empleado. Sin embargo, el progreso en la mejora para resistencia al TYLCV ha sido lento debido a su complejo control genético, la existencia de barreras de cruzabilidad entre las especies donantes de las mejores fuentes de resistencia y la ausencia de métodos estándar para la evaluación de la misma.

La expresión de los genes de resistencia depende en muchos casos de varios factores, como el fondo genético de la variedad receptora, la especie viral y las condiciones ambientales del lugar donde se realiza el cultivo. Esto ha supuesto un grave problema para la selección de plantas resistentes, sobre todo cuando los genes de resistencia de los que se dispone, como es el caso que nos ocupa, no son totalmente dominantes y no confieren una resistencia total. Con frecuencia, materiales que en un determinado ambiente exhiben una elevada resistencia, pueden comportarse como medianamente resistentes cuando el ensayo se realiza en otro lugar en un ambiente marcadamente distinto. Este hecho ha sido puesto de manifiesto en materiales resistentes al TYLCV portadores de genes de resistencia de diferentes especies silvestres (Picó et al., 1998; Vidavsky et al., 1998; Lapidot et al., 2000). En estas circunstancias, el empleo de un solo control susceptible y otro resistente para comparar los niveles de resistencia no es suficiente.

Para solventar el problema de la falta de un método estándar y la variabilidad en la expresión de los genes de resistencia en función de diversos factores, Lapidot et al. (2006) desarrollaron una escala compuesta por materiales homocigóticos con diversos niveles de resistencia introgresada a partir de distintas especies silvestres. La escala está

compuesta por siete líneas, incluyendo como extremos una línea susceptible y otra con elevada resistencia. En la presente tesis se evaluó el nivel de resistencia de estos materiales en diferentes condiciones, incluyendo localidad, aislados virales, métodos de inoculación, edad de las plantas y condiciones ambientales. La evaluación se realizó hasta un periodo de cerca de dos meses con objeto de comprobar si existe capacidad de recuperación, respuesta observada frecuentemente en materiales inoculados con este virus. Fuera del marco de la presente tesis, una vez finalizada la colección de líneas de introgresión a partir de la entrada PI 126944, tendrá que ser evaluada por su resistencia a TYLCD. Al tratarse probablemente de una resistencia cuantitativa, dados los resultados disponibles hasta el momento, la disponibilidad de controles con distinto grado de resistencia constituirá sin duda una valiosa herramienta que permitirá determinar con mayor precisión el nivel de resistencia de las líneas que contengan distintos fragmentos de *S. peruvianum* portadores de genes de resistencia.

La lista de líneas con niveles variables de resistencia se evaluó en siete ensayos, cuatro de ellos llevados a cabo en el COMAV-UPV y los otros tres en el Instituto Nacional de Ciencias Hortícolas de Cuba. En los ensayos efectuados en el COMAV las inoculaciones se realizaron en jaula con malla antimosca, empleando el vector *Bemisia tabaci*. Varió la época de cultivo (primavera-verano frente a otoño-invierno) y la edad de la planta a la que fue inoculada (plántulas de 14 o de 28 días). En Cuba, la edad de la planta fue un factor constante, inoculando plántulas en el estadio de desarrollo de dos hojas verdaderas. Sin embargo, varió el método de inoculación (inoculación en masa o agroinoculación) y la estación de cultivo (primavera, verano y otoño). Si consideramos por separado los ensayos realizados en cada país, incluyendo los llevados a cabo por Lapidot et al. (2006) en Israel, en general se observó una reducción en la gravedad de los síntomas cuando los ensayos se realizaron a temperaturas menos elevadas (estación de cultivo de otoño) y cuando las plantas se inocularon a edad más avanzada. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores (Levy y Lapidot 2008). Esto no invalida la utilización de la escala para la determinación del nivel de resistencia de otros genotipos por comparación con estos materiales, ya que el orden de los mismos según la gravedad de los síntomas se mantuvo inalterable, salvo algunas excepciones. Sin embargo, las diferencias más relevantes en el comportamiento de las líneas se encontraron al comparar de forma conjunta los ensayos realizados en España frente a los de Cuba. Las variaciones más notables se observaron en las líneas STY-2 y STY-7, una de las más

susceptibles y la de mayor nivel de resistencia respectivamente, según los datos aportados por Lapidot et al. (2006). STY-2 presentó en España una resistencia intermedia, mientras que en Cuba fue catalogada como susceptible. Por su parte, STY-7 fue muy resistente en los ensayos de España, mientras que en Cuba, presentó resultados diferentes en función del ensayo, mostrándose susceptible en dos ellos. Por el contrario, las líneas STY-4 y STY-5, con niveles intermedios de resistencia, según los ensayos de España, mostraron una resistencia más elevada en Cuba. El comportamiento de las líneas en los ensayos efectuados en Israel (Lapidot et al., 2006) fue muy similar al observado en los ensayos de España, con la salvedad de la línea STY-3, que en España tuvo mayores niveles de resistencia. Este caso podría explicarse por el distinto tipo de crecimiento de esta línea (crecimiento semi-determinado) frente al de las demás (crecimiento determinado). El crecimiento semi-determinado le confiere un mayor vigor que puede contribuir a que los síntomas se manifiesten con menor gravedad, como fue sugerido por los autores de la escala (Lapidot et al., 2006) y comprobado en repetidas ocasiones en otros ensayos.

Las notables diferencias en el comportamiento de las líneas provocan un cambio de orden de las mismas por su nivel de resistencia, en especial al comparar los ensayos desarrollados en España y Cuba. Este hecho condiciona su utilización como lista de referencia a nivel internacional, puesto que el conjunto de variables ambientales existentes en ambos ensayos repercute sobre la manifestación de la resistencia parcial de las líneas. Un factor añadido es la diferencia en los genes de resistencia introducidos en el conjunto de líneas. Así, mientras que las líneas STY-6 y STY-7 portan resistencia derivada de varias entradas de *S. peruvianum* (Friedmann et al., 1998; Lapidot et al., 2006), las otras líneas provienen de materiales comerciales, cuya resistencia no ha sido desvelada por sus obtentores, aunque se presume que puede derivar de la especie *S. chilense* (Picó et al., 1996). Los genes de resistencia empleados en cada caso pueden tener mecanismos de resistencia distintos y, consecuentemente, variar su expresión de forma diferencial frente a cambios en los factores comentados. Los propios autores que desarrollaron la escala (Lapidot et al., 2006), a partir de sus experimentos en los que ensayaron las líneas en diferentes condiciones (edad de la planta, estación de cultivo), concluyeron que puede no ser necesario utilizarlas todas. En concreto, en sus condiciones, propusieron eliminar la línea STY-6, por comportarse de forma muy similar a la STY-7 y provenir del mismo programa de mejora con resistencia introgresada a partir de *S. peruvianum*, y la línea STY-3 que, por su diferente tipo de crecimiento lleva a dificultades

en la comparación. A partir de los ensayos efectuados en este Tesis, nuestra propuesta coincide en parte con la realizada por Lapidot et al. (2006), aconsejando utilizar una línea susceptible (STY-1), otra resistente (STY-7) y otra con resistencia intermedia (STY-4), ya que las diferencias en la expresión de los síntomas entre las líneas extremas (susceptible y resistente) fue muy evidente, pero varias de las líneas con resistencia intermedia tuvieron síntomas con gravedad similar. Además, con el objeto de aumentar el poder discriminante, sería interesante incluir otra línea con bajo nivel de resistencia derivada de otra especie silvestre. Se propone el empleo de materiales derivados de *Solanum pimpinellifolium* (Pérez de Castro et al., 2007).

Hay que decir, por último, que el método de inoculación puede ser determinante en los resultados que se obtengan (Picó et al., 1998). En uno de los ensayos realizados en Cuba se utilizó la agroinoculación, dando lugar a notables diferencias en el comportamiento de los materiales y superando la resistencia de las dos líneas con mayor nivel de la misma, STY-6 y STY-7. Esto evidencia que la distinta vía de entrada del virus en la planta ocasiona una superación de los genes provenientes de *S. peruvianum*, mientras que no ocurre lo mismo con la resistencia derivada de otras fuentes. Por ello, para el cribado de materiales intermedios en programas de mejora se recomienda emplear la forma natural de infección mediante el vector, evitando así posibles fenómenos de no preferencia ocasionados por la especie silvestre donante de la resistencia (Kheyr-Pour et al., 1994; Picó et al., 2001).

BIBLIOGRAFÍA

- Anbinder, I., Reuveni, M., Azari, R., Paran, I., Nahon, S., Shlomo, H., Chen, L., Lapidot, M., and Levin, I. (2009). Molecular dissection of *Tomato leaf curl virus* resistance in tomato line TY172 derived from *Solanum peruvianum*. *Theoretical and Applied Genetics* 119: 519-530
- Barbano PP, Topoleski LD (1984) Postfertilization hybrid seed failure in *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon peruvianum* ovules. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 109:95-100

- Blanca J, Cañizares J, Cordero L, Pascual L Diez MJ, Nuez F (2012) Variation revealed by SNP genotyping and morphology provides insight into the origin of the tomato. *PLoS One*, 7:e48198
- Cap GB, Roberts PA, Thomason IJ, Murashige T (1991) Embryo culture of *Lycopersicon esculentum* x *L. peruvianum* hybrid genotypes possessing heatstable resistance to *Meloidogyne incognita*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 116:1082-1088
- Cap GB, Roberts PA, Thomason IJ (1993) Inheritance of heat-stable resistance to *Meloidogyne incognita* in *Lycopersicon peruvianum* and its relationship to the *Mi* gene. *Theoretical and Applied Genetics* 85:777-783
- Chen L, Adachi T (1992) Embryo abortion and efficient rescue in interspecific hybrids, *Lycopersicon esculentum* and the '*peruvianum-complex*'. *Japanese Journal of Breeding* 42:65-77
- Chen L, Adachi T (1996) Efficient hybridization between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum* via 'embryo rescue' and in vitro propagation. *Plant Breeding* 115: 251-256
- Cohen S, Antignus Y (1994) Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), a whitefly-borne geminivirus of tomatoes. *Advances in Disease Vector Research* 10:259-288
- da Costa Silva, Ribeiro C, Britto Giordano L (2001) Método de obtenção de híbridos interespecíficos entre *Lycopersicon esculentum* e *L. peruvianum*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 36:793-799
- Doganlar S, Frary A, Tanksley SD (1997) Production of interspecific F₁ hybrids, BC₁, BC₂ and BC₃ populations between *Lycopersicon esculentum* and two accessions of *Lycopersicon peruvianum* carrying new root-knot nematode resistance genes. *Euphytica* 95:203-207
- Encina CL, Carmona-Martin E, Fernández-Muñoz R (2012) Embryo Rescue of *Solanum lycopersicum* × *S. peruvianum* Tomato Cross for ToCV Resistance. *Acta Horticulturae* 935:91-94

- 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* 123:1004-1007
- Fulton TM, Nelson JC, Tanksley SD (1997) Introgression and DNA marker analysis of *Lycopersicon peruvianum*, a wild relative of the cultivated tomato, into *Lycopersicon esculentum*, followed through three successive backcross generations. *Theoretical and Applied Genetics* 95:895-902
- Grandillo S, Termolino P, Van der Knaap E (2013) Molecular mapping of Complex Traits in Tomato. In: Leidl BE, Labate JA, Stommel JR, Slade A, Kole Ch (Ed) *Genetics, Genomic and Breeding of Tomato*, CRC Press, US, pp. 150-228
- Hutton SF, Scott JW (2014) *Ty-6*, a major begomovirus resistance gene located on chromosome 10. *Report of the Tomato Genetics Cooperative* 64:14-18
- Imanishi S (1988) Efficient ovule culture for the hybridization of *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum*, *L. glandulosum*. *Japanese Journal of Breeding* 38:1-9
- Imanishi S, Nagata N, Hiura I, Watanabe Y (1985) Studies on the interspecific crosses between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum*. 2 Varietal difference in *L. peruvianum* and in the in vitro culture in the first backcross. *Japanese Journal of Breeding* 35:88-89
- Ji Y, Schuster DJ, Scott JW (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* 20:271-284
- Ji Y, Scott JW, Schuster DJ, Maxwell DP (2009) Molecular mapping of *Ty-4*, a new Tomato yellow leaf curl virus resistance locus on chromosome 3 of tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 134:281-288
- Julián O, Herraíz J, Corella S, Lolli I, Soler S, Díez MJ, Pérez de Castro (2013) A Initial development of a set of introgression lines from *Solanum peruvianum* PI 126944 into tomato: Exploitation of resistance to viruses. *Euphytica* 193:183-196
- Kaloo G (1991) Interspecific and intergeneric hybridization in tomato. In: *Genetic improvement of tomato*. Berlin: Springer-Verlag, pp. 73-82

- Kheyr-Pour A, Gronenborn B, Czosnek H (1994). Agroinoculation of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) overcomes the virus resistance of wild *Lycopersicon* species. *Plant Breeding* 112:228-233
- Lai A, Chiaretti D, Mini P, Bitti ME, Crino P (1990) Parameters influencing embryo rescue in interespecific *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon peruvianum*. In: Eucarpia Meeting on Tomato Genetics and Breeding, 11, 1990, Malaga. Proceeding. Malaga: European Association for Research on Plant Breeding 173-177
- Lai A, Chiaretti D, Mini P, Bitti ME, Crino P (1990) Parameters influencing embryo rescue in interspecific *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon peruvianum*. In: Cuartero J, Gomez-Guillamon ML, Fernandez Munoz R (Ed) Proc. of XIth Eucarpia meeting on tomato genetics. Malaga, Spain, pp. 173–177
- Lapidot M, Goldray O, Ben Joseph R, Cohen S, Friedmann M, Shlomo A, Nahon S, Chen L, Pilowsky M (2000) Breeding tomatoes for resistance to tomato yellow leaf curl begomovirus. *Bulletin OEPP/EPPO* 30:317-321
- Lapidot M, Ben-Joseph R, Cohen L, Machbash Z, Levy D (2006) Development of a scale for evaluation of *Tomato yellow leaf curl virus* resistance level in tomato plants. *Phytopathology* 96:1404-1408
- Levin I, Karniel U, Fogel D, Reuveni M, Gelbart D, Evenor D, Chen L, Nahon S, Shlomo H, Machosh Z, Lapidot M (2013) Cloning and analysis of the Tomato yellow leaf curl virus resistance gene *ty-5*. 44th Tomato breeders round table meeting, Chiang Mai, Thailand
- Levy D, Lapidot M (2008) Effect of plant age at inoculation on expression of genetic resistance to tomato yellow leaf curl virus. *Archives of Virology* 153:171-179
- Miller JC, Tanksley SD (1990) RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theoretical and Applied Genetics* 80:437-448
- Pérez de Castro A, Díez MJ, Nuez F (2007) Inheritance of Tomato yellow leaf curl virus resistance derived from *Solanum pimpinellifolium* UPV16991. *Plant Disease* 91:879-885

- Picó B, Díez MJ, Nuez F (1996) Viral disease causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. *The Tomato yellow leaf curl virus*- a review. *Scientia Horticulturae* 67:151–196
- Picó B, Díez MJ, Nuez F (1998) Evaluation of whitefly-mediated inoculation techniques to screen *Lycopersicon esculentum* and wild relatives for resistance to *Tomato yellow leaf curl virus*. *Euphytica* 101:259-271
- Picó B, Ferriol M, Díez MJ, Nuez F (2001) Agroinoculation methods to screen wild *Lycopersicon* for resistance to *Tomato yellow leaf curl virus*. *Journal of Plant Pathology* 83:215-220
- Picó B, Herráiz J, Ruíz JJ, Nuez F (2002) Widening the genetic basis of virus resistance in tomato. *Scientia Horticulturae* 94:73-89
- Pratta G, Zorzoli R, Picardi LA (1999) Obtención y micropropagación de híbridos intra e interespecíficos de tomate (género *Lycopersicon*). *Biotecnología Aplicada* 16:242-245
- Roselló S, Soler S, Díez MJ, Rambla JL, Richarte C, Nuez F (1999) New sources for high resistance of tomato to the tomato spotted wilt virus from *Lycopersicon peruvianum*. *Plant Breeding* 118:425-429
- Segeren MI, Sondahl MR, Siqueira WJ, Medina Silho HP, Nagai H, Lourenção AL (1993) Tomato Breeding: 1. Embryo rescue of interspecific hybrids between *Lycopersicon esculentum*, MILL. and *L. peruvianum* (L.) MILL. *Revista Brasileira de Genética* 16:367-380
- Smith PG (1944) Embryo culture of a tomato species hybrid. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 44:413-416
- Stevens MA, Rick CM (1986) Genetics and breeding. In: Atherton JG, Rudich J (eds) *The TOMATO Crop. A Scientific Basis for Crop Improvement*. Chapman and Hall, London 35-109
- Thomas BR, Pratt D (1981) Efficient hybridization between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum* via embryo callus. *Theoretical and Applied Genetics* 59:215-219
- Vidavsky F, Leviatov S, Milo J, Rabinowitch HD, Kedar N, Czosnek H (1998) Response of tolerant breeding lines of tomato, *Lycopersicon esculentum*, originating from three

different sources (*L. peruvianaum*, *L. pimpinellifolium* and *L. chilense*) to early controlled inoculation by tomato yellow leaf curl virus (TYLCV). *Plant Breeding* 117:165-169

Yang X, Caro M, Hutton SF, Scott JW, Guo Y, Wang X, Rashid MH, Szinay D, de Jong, H, Visser RG, Bai Y, Du Y (2014). Fine mapping of the tomato yellow leaf curl virus resistance gene *Ty-2* on chromosome 11 of tomato. *Molecular Breeding* 34:749-760

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 HD, Czosnek H (1994) Mapping and introgression of a Tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, *Ty-1*. *Theoretical and Applied Genetics* 88:141-146

CONCLUSIONES

- 1.- En cruces entre materiales derivados de *Solanum peruvianum*, utilizados como parentales masculinos, y el tomate cultivado, la obtención de descendientes depende en gran medida del genotipo del parental masculino. Esto puede ser debido a las marcadas diferencias en cuanto a los fragmentos del parental silvestres introgresados en cada planta utilizada como parental masculino.
- 2.- El rendimiento, medido como el número de plantas obtenido/número de semillas inmaduras sembradas, aumenta considerablemente al comparar en conjunto los parentales masculinos de las generaciones pseudo- F_n (rendimiento = 0,6%), pseudo- F_nBC_1 (4%) y pseudo- F_nBC_2 (30%), demostrando la superación de las barreras de incompatibilidad a medida que se avanza en la obtención de retrocruces.
- 3.- En el medio de cultivo empleado en la siembra de las semillas inmaduras, la combinación de zeatina y ácido indolacético permitió incrementar la eficiencia, de forma comparable al medio de cultivo que incluía únicamente zeatina. Este último medio fue el seleccionado para realizar los siguientes ensayos.
- 4.- La vía de regeneración mayoritaria en el primer ensayo fue la formación de callos, mientras que en el segundo y tercer ensayos la vía predominante fue la germinación directa. Este hecho podría deberse a la menor probabilidad de germinación directa del embrión cuando se cruzan materiales más alejados, como es el caso de las generaciones F_n en el primer ensayo, mientras que en los siguientes ensayos los parentales masculinos utilizados fueron plantas de generaciones BC_1 obtenidas a partir de distintas generaciones F_n .
- 5.- La selección de las semillas inmaduras de mayor tamaño dio lugar a un mayor rendimiento, obteniéndose un mayor número de descendientes. De igual forma, la realización de un corte en la cubierta de las semillas tuvo un efecto claramente positivo sobre la eficiencia, facilitando el desarrollo del embrión y, consecuentemente, la obtención de descendientes.
- 6.- En los ensayos efectuados dentro de cada país (España y Cuba) con la escala de materiales desarrollada por Lapidot et al (2006), se observó una reducción en la gravedad de los síntomas cuando se realizaron a temperaturas menos elevadas, en la estación de cultivo de otoño, y cuando las plantas se inocularon a edad más avanzada. Esto no invalida la utilización de la escala para la determinación del nivel de resistencia de otros genotipos

por comparación con estos materiales, ya que el orden de los mismos según la gravedad de los síntomas se mantuvo inalterable, salvo algunas excepciones.

7.- La utilización de la agroinoculación en uno de los ensayos realizados en Cuba dio lugar a notables diferencias en el comportamiento de los materiales, superando la resistencia de las dos líneas derivadas de *S. peruvianum* con mayor nivel de la misma, STY-6 y STY-7. Esto evidencia que la distinta vía de entrada del virus en la planta ocasiona una superación de los genes provenientes de *S. peruvianum*, mientras que no ocurre lo mismo con la resistencia derivada de otras fuentes.

9.- A partir de los ensayos efectuados en esta Tesis, nuestra propuesta coincide en parte con la realizada por Lapidot et al. (2006), aconsejando utilizar una línea susceptible (STY-1), otra resistente (STY-7) y otra con resistencia intermedia (STY-4), ya que las diferencias en la expresión de los síntomas entre las líneas extremas, susceptible y resistente, es muy evidente, pero varias de las líneas con resistencia intermedia tuvieron síntomas con gravedad similar. Además, con el objeto de aumentar el poder discriminante, sería interesante incluir otra línea con bajo nivel de resistencia derivada de otra especie silvestre. Se propone para ello el empleo de materiales derivados de *Solanum pimpinellifolium*.