

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

INSTITUT DE CONSERVACIÓ I MILLORA DE L'AGRODIVERSITAT VALENCIANA

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

MÀSTER INTERUNIVERSITARI OFICIAL EN MILLORA GENÈTICA VEGETAL



Instituto de Conservación y Mejora
de la Agrodiversidad Valenciana

MILLORA GENÈTICA DE LA “TOMACA VALENCIANA D’EL
PERELLÓ” PER A LA RESISTÈNCIA AL VIRUS DEL MOSAIC DE LA
TOMACA (TOMATO MOSAIC VIRUS, *ToMV*).

TREBALL DE FI DE MÀSTER EN MILLORA GENÈTICA VEGETAL

ALUMNE: DIONÍS BORRÀS PALOMARES

TUTOR: SALVADOR SOLER ALEIXANDRE

DIR. EXPERIMENTAL: M^a DEL ROSARIO FIGAS MORENO

CURS ACADÈMIC: 2015-2016

VALÈNCIA, 1 DE JULIOL DE 2016

MILLORA GENÈTICA DE LA “TOMACA VALENCIANA D’EL PERELLÓ” PER A LA RESISTÈNCIA AL VIRUS DEL MOSAIC DE LA TOMACA (TOMATO MOSAIC VIRUS, *ToMV*).

Abstract

The traditional valencian tomato is appreciated due to its organoleptic properties which confer to this tomato a high commercial interest. Specifically the “Tomaca Valenciana d’El Perelló” is increasingly appreciated by superstores. This tomato presents some agronomical and quality traits that make it very attractive for the farmer and the consumer. However, it sometimes shows production uniformity problems as well as other important problems. Moreover, this variety presents high susceptibility to the Tomato Mosaic Virus (*ToMV*). So, a very interesting way to maximize this crop is to obtain varieties of valencian tomato more uniform and with resistance to *ToMV*. In this study a selection program and a plant breeding program are made through Back Crosses Method in which the intension is to increase the uniformity on the production and other morphological traits and at the same time to introgress the *Tm2²* gene. The selection of resistance carrier is made by Molecular Assisted Selection and checked by inoculation and ELISA analysis. In these moments the fourth self-crossing generation coming from the selection program is available. Furthermore the Second Backcross is available and the third backcross is being generated.

Resum

La tomaca tradicional valenciana és apreciada per les seues propietats organolèptiques que li atorguen un alt interès comercial. En concret la ‘Tomaca Valenciana d’El Perelló’ és cada vegada més apreciada en les superfícies comercials. Aquesta tomaca presenta diferents trets agronòmics i de qualitat que la fan atractiva per al llaurador i per al consumidor. No obstant, de vegades presenta problemes de uniformitat de producció així com d’altres característiques importants. D’altra banda, aquesta varietat presenta una elevada susceptibilitat al virus del mosaic de la tomaca (*ToMV*). Així, una forma molt interessant de potenciar aquest cultiu és obtenir varietats de tomaca valenciana més uniformes així com resistents a *ToMV*. En aquest treball és du a terme tant un programa de selecció així com un programa millora genètica mitjançant el Mètode de Retrocreuaments amb el qual es pretén per una banda augmentar la uniformitat de producció i la presència de trets morfològics distintius d’aquesta varietat, a la vegada que s’introgressa el gen de resistència a *ToMV* (*Tm2²*). La selecció dels individus portadors de la resistència es realitza mitjançant Selecció Assistida per Marcadors i es comprova mitjançant inoculació i anàlisi ELISA. En aquests moments es disposa de la quarta generació d’autofecundació en el programa de selecció així com del segon Retrocreuament (RC2). Al mateix temps s’està duent a terme el tercer Retrocreuament (RC3).

Resumen

El tomate tradicional valenciano es apreciado por sus propiedades organolépticas que le otorgan un alto interés comercial. En concreto el “Tomate Valenciano d’El Perelló” es cada vez más apreciado en las superficies comerciales. Este tomate presenta diferentes rasgos agronómicos y de calidad que lo hacen atractivo para el agricultor y para el consumidor. No obstante, a veces presenta problemas de uniformidad de producción así como de otras características importantes. Por otra parte, esta variedad presenta una elevada susceptibilidad al virus del mosaico del tomate (*ToMV*). Así, una forma muy interesante de potenciar este cultivo es obtener variedades de tomate valenciano más uniforme así como resistentes a *ToMV*. En este trabajo se lleva a cabo un programa de selección así como un programa de mejora genética mediante el Método de Retrocruzamientos con el que se pretende por una parte aumentar la uniformidad de producción así como la presencia de rasgos morfológicos característicos de esta variedad, a la vez que se introgressa el gen de resistencia a *ToMV* (*Tm2²*). La selección de los individuos portadores de la resistencia se realiza mediante la Selección Asistida por Marcadores y se comprueba mediante inoculación y análisis ELISA. En estos momentos se dispone de la cuarta generación de autofecundación en el programa de selección si como del segundo Retrocruzamiento (RC2). Al mismo tiempo se está llevando a cabo el tercer Retrocruzamiento (RC3).

Key words: Tomato, *Solanum lycopersicum*, *ToMV*, *Tm2²*, SNPs, Backcross, High Resolution Melting

Paraules clau: Tomaca, *Solanum lycopersicum*, *ToMV*, *Tm2²*, SNPs, Retrocreuament, High Resolution Melting

Alumne: Dionís Borràs Palomares

Tutor: Salvador Soler Aleixandre

Dir. Experimental: M^a Del Rosario Figàs Moreno

València, Juliol 2016

AGRAÏMENTS

Com tot en aquesta vida, allò que comença tard o prompte ha d'acabar. Hi ha coses que t'agradaria que duraren per sempre i d'altres, en canvi, que desitges que acaben tant prompte com siga possible. El cert és que a hores d'ara no sé ben bé on s'encaixa aquesta etapa, el que sí que tinc clar és que en aquest viatge pel coneixement m'han acompanyat moltes persones sense les quals no haguera pogut ser possible. També com tot en aquesta vida, hi ha persones que et marquen un abans i un després, i d'altres, que passen més discretament pel teu costat. Si haguera d'elegir em quedaria en **“L'Alegria de l'horta”** que tot i ser al·lèrgica a les solanàcies, et contagia amb les seues bones vibracions. També em quedaria amb **“La viquipèdia personalitzada”** que m'ha fet de consultoria personal les 24h. També em quedaria amb **“ La persona més maniàtica per l'ordre d'Espanya i part de l'estranger”**. Una altra peça clau en aquesta història és **“El patriarca que cuida de tots”** amb el qual també em quedaria. D'altres persones, encara que d'incorporació més recent en aquesta història, també han aportat el seu gra.

És curiós agrair que proven de sal la paella que tu has cuinat. Però una cosa és clara i és que sense els ingredients adequats cap paella es pot cuinar. En definitiva, gràcies a tot el món, que en major o menor implicació, ha participat activament per fer possible tot això.

Nota per al Dionís del futur: No oblidés que tota experiència és enriquidora. No oblidés a cap persona que no haja de ser oblidada. Pensa que ~~quasi~~ tot és possible. I que encara que vagés sense direcció, sense brúixola ni timó, el teu camí serà el que tu t'obligues.

ÍNDIX

1. INTRODUCCIÓ	1
1.1 CULTIU DE LA TOMACA.....	1
1.1.1 ORIGEN, DOMESTICACIÓ I DIFUSIÓ	1
1.1.2 SITUACIÓ ACTUAL DEL CULTIU DE LA TOMACA.....	1
1.2 PERSPECTIVA HISTÒRICA DEL POBLE VALENCIÀ COM A AGRICULTOR.....	3
1.3 VARIETATS TRADICIONALS DE TOMACA.....	4
1.3.1 VARIETATS TRADICIONALS VALENCIANES.....	5
1.3.1.1 TOMACA TIPUS “BORSETA”	7
1.3.1.2 TOMACA TIPUS “DE PENJAR”	7
1.3.1.3 TOMACA TIPUS “DE PRUNA”	7
1.3.1.4 TOMACA TIPUS “MUTXAMEL”	8
1.3.1.5 TOMACA TIPUS “DEL PEBRE”	8
1.3.1.6 TOMACA TIPUS “VALENCIANA”	8
1.4 POSADA EN VALOR DE LES VARIETATS TRADICIONALS.....	12
1.4.1 VARIETATS TRADICIONALS COM A ALTERNATIVA RENTABLE.....	13
1.4.2 LA TOMACA “VALENCIANA” COM A ALTERNATIVA RENTABLE.....	14
1.4.2.1 CARACTERÍSTIQUES GENERALS.....	14
1.4.2.2 IMPORTÀNCIA ECONÒMICA.....	15
1.4.2.3 POSADA EN VALOR DE LA TOMACA TIPUS “VALENCIANA”	15
1.4.2.3.1 POSADA EN VALOR A TRAVÉS DE LA “SELECCIÓ”	16
1.4.2.3.2 POSADA EN VALOR A TRAVÉS DE LA “MILLORA”	16
2. OBJECTIUS	17
3. MATERIAL I MÈTODES	18
3.1 MATERIAL VEGETAL.....	18
3.1.1 EN EL PROGRAMA DE “SELECCIÓ”	18
3.1.2 EN EL PROGRAMA DE “MILLORA”	18
3.2 DESINFECCIÓ DE LLAVORS I REALITZACIÓ DE PLANTERS.....	18
3.3 CONDICIONS DE CULTIU.....	19
3.4 REALITZACIÓ DELS CREUAMENTS.....	20
3.4.1 RECOL·LECCIÓ DE POL·LEN DEL PARENTAL MASCULÍ.....	20
3.4.2 EMASCULACIÓ I POL·LINITZACIÓ DE LES FLORS DEL PARENTAL FEMENÍ.....	20
3.5 DESCRIPCIÓ DEL PROGRAMA DE MILLORA REALITZAT.....	21
3.5.1 EN EL PROGRAMA DE “SELECCIÓ”	21
3.5.2 EN EL PROGRAMA DE “RETROCREUAMENTS”	21
3.6 MARCADOR MOLECULAR ASSOCIAT AL GEN DE RESISTÈNCIA $Tm2^2$	25
3.7 DISSENY D’ENCEBADORS.....	25

3.8	EXTRACCIÓ D'ADN.....	25
3.9	ANÀLISI D'SNPS MITJANÇANT "HIGH RESOLUTION MELTING"	26
3.10	INOCULACIÓ MECÀNICA DE <i>ToMV</i> PER A VALIDAR LA RESISTÈNCIA.....	26
3.10.1	PREPARACIÓ DE L'INÒCUL I INOCULACIÓ.....	26
3.10.2	ANÀLISI SEROLÒGIC DE LES MOSTRES.....	26
4.	RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	19
4.1	GENERACIONS OBTINGUDES.....	19
4.1.1	EN EL PROGRAMA DE SELECCIÓ.....	19
4.1.2	EN EL PROGRAMA DE RETROCREUAMENTS.....	19
4.2	GENOTIPAT D'HETEROZIGOTS: ANÀLISI DE L'SNP ASSOCIAT A L'AL·LEL DE RESISTÈNCIA.....	22
4.3	VALIDACIÓ DE LA RESISTÈNCIA A <i>ToMV</i> MITJANÇANT LA INOCULACIÓ MECÀNICA DEL VIRUS.....	23
5.	CONCLUSIONS.....	25
6.	BIBLIOGRAFIA.....	26

ÍNDIX DE TAULES

Taula 1. Superfície de cultiu, volum de producció i Rendiment al territori valencià especificat per províncies en 2013.

Taula 2. Estudis de caracterització de varietats tradicionals de tomaca duts a terme a València.

Taula 3. Encebadors emprats per a dur a terme el genotipat per al gen Tm2²

Taula 4. Característiques morfològiques dels llinatges seleccionats en el programa de selecció.

Taula 5. Informació de les plantes procedents del creuament inicial (C1) de les plantes de les seleccions per l'híbrid Euphrates.

Taula 6. Informació de les plantes procedents del Primer Retro-creuament (RC1).

Taula 7. Informació de les plantes procedents del RC2

Taula 8. Caracterització morfològica dels individus heterozigots procedents del RC1 llinatge COOP 886-54

ÍNDIX DE GRÀFICS I FIGURES

Gràfic 1. Producció de tomaca a la Unió Europea en 2014 expressada en milions de tones.

Gràfic 2. Producció de tomaca en Espanya en 2014 expressada en Tones.

Figura 1. Tribunal de les Aigües de València

Figura 2. Imatge de fruits del tipus varietal "De Borseta".

Figura 3. Imatge de fruits del tipus varietal "Del Pebre".

Figura 4. Imatge de fruits del tipus varietal "De Penjar"

Figura 5. Imatge de fruits del tipus varietal "De Pruna".

Figura 6. Imatges de fruits del tipus varietal " Mutxamel".

Figura 7. Imatge de fruites del tipus varietal "Valenciana" morfologia "Mascllet"

Figura 8. Imatge de fruites del tipus varietal Valenciana, morfologia " Femella".

Figura 9. Imatge d'una fruita del tipus varietal "Valenciana" morfologia "Rotllo".

Figura 10. Tomaca de Penjar. Presentació al consumidor d'un ramell.

Figura 11. Tomaca "Valenciana d'El Perelló" a un supermercat valencià.

Figura 12. Procés de desinfecció de llavor.

Figura 13. Procés de recol·lecció de pol·len.

Figura 14. Procés d'emasculació i pol·linització de la flor del parental femení.

Figura 15. Esquema del programa Selecció utilitzat.

Figura 16. Esquema del programa de Retrocreuaments a partir de la selecció massal COOP 767.

Figura 17. Esquema del programa de Retrocreuaments a partir de la selecció massal COOP 886.

Figura 18. Anàlisi de corbes d'HRM.

Figura 19. Planta heterozigòtica i planta homozigòtica recessiva en el cicle on va haver el brot de *ToMV*.

ABREVIACIONS

ADN: Àcid desoxiribonucleic

bp: Parells de bases

C1: Creuament inicial

DAS-ELISA: Double Antibody Sandwich-Enzyme linked Immunosorbent Assay

FAO: Food and Agriculture Organization

GEVES: Groupe d'Etude et de contrôle des Variétés Et des Semences

HRM: High Resolution Melting

MAGRAMA : Ministeri d'Agricultura, Alimentació i Medi Ambient

RC1: Primer Retrocreuament

RC2: Segon Retrocreuament

RC3: Tercer Retrocreuament

SNP: Single Nucleotid Polimorphism

ssRNA: Single Strand Ribonucleic Acid

Tm: Temperatura d'annealing

ToMV: Tomato Mosaic Virus

TSP: Trifosfat de Sodi

TSWV: Tomato spotted wilt virus,

TYLCV: Tomato yellow leaf curl virus

USDA: United States Department of Agriculture

1. INTRODUCCIÓ

1.1. CULTIU DE LA TOMACA

1.1.1 ORIGEN, DOMESTICACIÓ I DIFUSIÓ

Les Solanàcies són una família de plantes herbàcies dins de la qual es troben espècies tant importants com ara la creïlla, l'albergínia, el pebre o la tomaca. Aquesta última rep el nom científic de *Solanum lycopersicum* L. i es creu que té el seu centre d'origen a les regions andines del Perú, Xile, Equador i Bolívia. Els treballs realitzats indiquen que fou en Mèxic on els asteques la domesticaren ja que els primers conqueridors espanyols descriuen una gran varietat de formes, colors i mides que són comercialitzades. Recentment, Blanca et al. (2012) indiquen que va haver un procés de predomesticació que va ocórrer en la regió andina i que es va completar en Mesoamèrica abans de l'arribada dels espanyols.

Després de l'arribada dels espanyols a Amèrica la tomaca va ser introduïda a Europa i a la resta del món a inicis del segle XVI (Paran i Knaap, 2007). Tot indica que la primera varietat de tomaca en arribar a Europa fóra de color groc ja que a Itàlia la bategen com a "Pomodoro" o poma d'or (Nuez i Rodríguez, 1995).

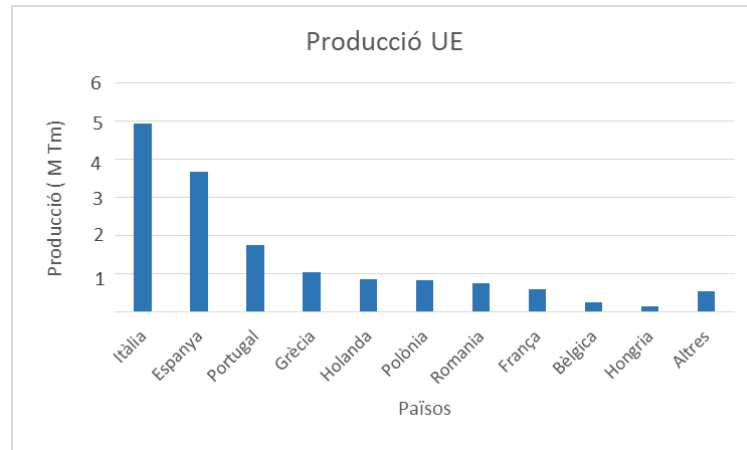
L'acceptació de la tomaca no va ser igual a tot arreu, és més, la majoria de països es mostraven reticents a incorporar-la a la gastronomia i sols la destinaven a ús ornamental. En canvi a Espanya i Itàlia s'acceptaria des del principi en l'alimentació. Aquesta situació es mantingué fins a finals del segle XVIII principis del XIX. Això podria haver-se degut a que les solanàcies europees eren riques en alcaloides, substàncies amb efectes desfavorables per a la salut humana (Esquinas i Nuez, 1995; Doré i Varoquaux, 2006).

1.1.2 SITUACIÓ ACTUAL DEL CULTIU DE LA TOMACA.

El consum de la tomaca es troba en constant creixement i és per això que el seu cultiu està àmpliament estès (Cuartero J., 2001) i que siga la segona hortalissa més cultivada al món després de la creïlla. Segons dades de la FAO en 2013 es superaren els 163 milions de tones (M Tm) quant a producció de tomaca.

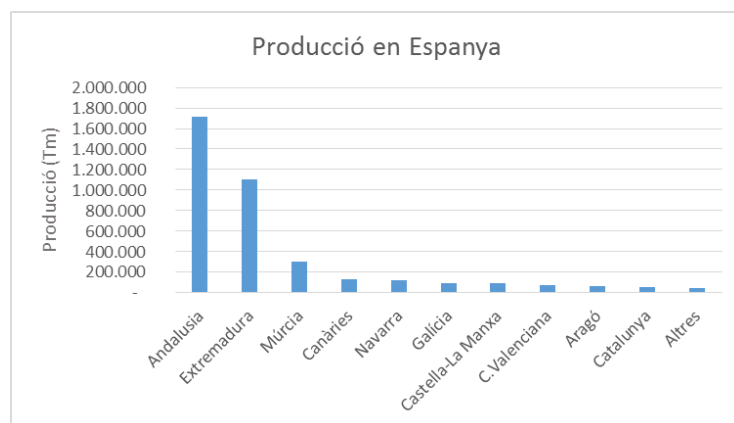
Pel que respecta als principals productors mundials, la llista l'encapçalen Xina amb 35,533 M Tm, Estats Units amb 12,778 M Tm, Índia amb 10,990 M Tm, Turquia amb 10,130 M Tm i Egipte amb 8,055 M Tm. Tots junts produeixen aproximadament uns 77 M Tm de tomaca a l'any de mitjana. És a dir, vora el 47% de la tomaca produïda al món prové només d'aquests 5 països. (FAO, 2014).

Si ens centrem en la Unió Europea (UE), la producció de tomaca total és d'uns 15,36 M Tm, o dit d'una altra manera, aproximadament el 9% de tota la tomaca produïda al món procedeix dels països pertanyents a la Unió Europea. Dintre d'ací, Espanya amb uns 3,68 M Tm juntament amb Itàlia que produeix uns 4,93 M Tm aporten més de la meitat de la tomaca que es recull a la Unió (Gràfic 1)(FAO, 2014).



Gràfic 1. Producció de tomaca a la Unió Europea en 2014 expressada en milions de tones. S'especifiquen els 10 primers països pel que fa a producció. La resta dels països integrants de la Unió Europea estan inclosos dins "d'Altres". Font faostat.fao.org

Si focalitzem la nostra atenció a la producció de tomaca en Espanya, segons la informació disponible en el Ministeri d'Agricultura, Alimentació i Medi Ambient (MAGRAMA) les principals regions productores són Andalusia, Extremadura i Múrcia. Aquestes tres produeixen vora el 80% de tota la tomaca espanyola. D'altra banda als territoris valencians es produeixen 72249 tones (octava posició a nivell estatal), equivalent al 2% aproximadament de la producció espanyola de tomaca (Gràfic 2). És de destacar, que el territori que més tones produeix és Alacant amb una producció mitjana anual d'unes 56391 tones. D'altra banda Castelló produeix unes 10750 tones mentre que València presenta una producció més humil d'unes 5108 tones (Taula 1).



Gràfic 2. Producció de tomaca en Espanya en 2014 expressada en Tones. S'especifiquen les 10 primeres comunitats pel que fa a producció. La resta s'inclouen en "Altres".

Taula 1. Superfície de cultiu, volum de producció i Rendiment al territori valencià especificat per províncies en 2013. Font: magrama.org.es

Províncies	Superfície (ha)			Rendiment (kg/ha)			Producció (Tm)	
	Secà	Regadiu		Secà	Regadiu			
		Aire lliure	Protegit		Total	Aire lliure		Protegit
Castelló	64	464	16	544	10.000	20.651	33.000	10.750
València	-	22	100	122	-	20.000	46.678	5.108
Alacant	-	57	477	534	-	33.000	114.277	56.391
Comunitat Valenciana	64	543	593	1.200	10.000	21.921	100.685	72.249

1.2 PERSPECTIVA HISTÒRICA DEL POBLE VALENCIÀ COM A AGRICULTOR

El poble valencià si per alguna cosa s'ha caracteritzat des de sempre ha sigut per l'agricultura. I és que València compta amb una gran tradició hortícola. Un vestigi històric que ens ho recorda és l'entramat de sèquies que trobem a la Ciutat de València i que deriven de la primera xarxa de reg creada pels romans. Aquest sistema de reg evolucionaria i es perfeccionaria amb els quasi cinc segles de presència musulmana als territoris valencians (Regne moro de València). Hi ha indicis que apunten que l'assentament de les costums musulmanes derivarien en la creació del "Tribunal de les Aigües de València" a aquesta ciutat (Figura 1). Aquest tribunal a la vegada que actuava com a administrador de les sèquies també es comportava com a jurat en conjunt.



Figura 1. Tribunal de les Aigües de la Ciutat de València. Aquesta reunió es realitza tots els dijous a les 12:00h en la porta dels Apòstols de La Seu de la Ciutat de València. Font: transparençia.gva.es

Anys després, amb la conquesta cristiana, Jaume I va mantenir els sistemes d'administració de l'aigua com fins al moment havien fet els musulmans. És per això que es va poder mantenir la importància de l'agricultura en el regne cristià medieval de València.

Aquesta prioritització de l'agricultura s'ha mantingut fins temps contemporanis, fins al punt que segles després, en un avançament estadístic del 1911 (Junta consultiva agrícola, 1914) s'indicava que s'estaven destinant 4168 hectàrees del territori valencians a l'agricultura, superfície que pocs altres territoris espanyols superaven en aquell temps. Segons aquests avanços estadístics a València la tomaca juntament amb el meló i el meló d'Alger eren els cultius amb major importància econòmica al territori. És per això que els agricultors d'aquella època apostaren per la tomaca cosa que afavoriria la selecció durant molts anys generant així un in comptable nombre de varietats tradicionals les quals posseeixen una gran diversitat morfològica i organolèptica. Algunes d'aquestes avui dia les coneixem com "Valenciana", "Mutxamel", "De pruna", "De penjar" etc.

1.3 VARIETATS TRADICIONALS DE TOMACA

És evident que durant les últimes dècades ha esdevingut la major pèrdua de biodiversitat de la història contemporània causada principalment per la constant agressió al medi ambient així com la popularització dels monocultius comercials. És per això que hagen sorgit un fum de moviments conservacionistes a tot arreu del món. Aquests grups parlen de preservar al màxim la biodiversitat vegetal. Dit d'una altra manera, el que es pretén en l'actualitat és preservar el major tresor de què disposem, que són els recursos fitogenètics. Aquests tècnicament són la fracció de la biodiversitat potencialment útil per al desenvolupament agrícola. Entre tots els materials que componen els recursos fitogenètics destaquen pel seu gran valor les varietats tradicionals. Aquestes són aquells materials que no han sigut sotmesos a programes de millora genètica formal.

Si profunditzem en el concepte, les varietats tradicionals són aquells cultius que sent diversos per a la major part de característiques morfològiques, tenen certa integritat genètica, recognoscible morfològicament i que difereixen en l'adaptació a les condicions climàtiques, tipus de sòl, data de sembra, valor nutricional, ús etc. (Harlan, 1975).

Un dels trets més importants de les varietats tradicionals és la seua gran heterogeneïtat, o millor dit, la gran diversitat que presenten per a la major part de característiques morfològiques. Aquesta diversitat s'entén en dos sentits, és a dir, a nivell de varietat i a nivell intra-poblacional. En el cas de la tomaca tant a nivell varietal com dins d'una varietat tradicional concreta existeix una gran variabilitat en caràcters tant agro-morfològics com caràcters associats a la percepció organolèptica (Figàs et al., 2015a; Figàs et al., 2015b).

Per un altre costat, un concepte estretament lligat amb les varietats tradicionals que cal definir és "l'erosió genètica" i és que, com acabem de dir, en les últimes dècades ha esdevingut una pèrdua de biodiversitat alarmant, cosa que té com a efecte principal l'erosió genètica. Aquest concepte fa referència a la pèrdua de gens, combinació específica de gens, d'una varietat o de tota una espècie (FAO, 2011).

Amb el desenvolupament de les noves varietats híbrides a partir de la “revolució verda” s’ha contribuït a tot arreu del món a que les varietats primitives, tradicionals o locals siguin desplaçades i substituïdes pels nous materials vegetals. Aquest tret ha sigut especialment greu pel fet d’afectar, en molts casos, a països en procés de desenvolupament, els quals són els responsables de mantenir aquest tipus de varietats en els anomenats Centres de Diversitat, posant en perill el reservori de recursos fitogenètics. D’açò ja se’n van adonar els organismes responsables fa anys, fins el punt que en el primer informe sobre l’Estat dels Recursos Fitogenètics (FAO, 1996) s’apuntés a la substitució de varietats tradicionals com el principal causant d’erosió genètica.

1.3.1 VARIETATS TRADICIONALS VALENCIANES

Amb l’arribada de la tomaca al vell món, les primeres varietats es van anar adaptant a diferents condicions climàtiques així com als diferents gustos dels consumidors i agricultors. És per això, que els diferents processos d’adaptació, intercanvi de llavors, seleccions etc. esdevingueren en una gran diversificació de formes i tipus. D’aquesta manera aparegueren diverses varietats de tomaca adaptades a cadascuna de les múltiples condicions agroclimàtiques de les diferents comarques valencianes, així com als gustos dels distints pobles valencians. València, si es comparem amb altres autonomies, destaca pel seu gran nombre de tipus varietals cultivats. Cal tindre en compte, que els valencians gaudim d’un clima molt benigne on els agricultors han pogut conrear i seleccionar aquelles varietats més adequades per als seus gustos i usos particulars.

Quan parlem de varietats tradicionals, i en especial de tomaca, trobem diferents problemes a l’hora de classificar-les. Per un costat hi ha vegades on una mateixa varietat rep diferents noms així com diferents varietats molt paregudes reben un mateix nom. Per un altre costat, un altre problema que se’ns presenta a l’hora de catalogar les varietats locals de tomaca és que els resultats de la caracterització no concorden de vegades amb la informació de passaport obtinguda durant les prospeccions i recol·leccions de germoplasma.

Per últim, un altre problema que entrebanca la tasca de classificació és el fet que hi ha molts tipus varietals que al no ser varietats establides reben noms atenent a la forma del fruit, al lloc on es cultiva o fins i tot a una combinació d’ambdós. És per això que una rigorosa identificació i catalogació dels tipus varietals presents en cada territori moltes vegades no és una tasca fàcil. De fet, és necessària la realització d’estudis tant de caracterització morfològica com molecular per a d’aquesta manera definir millor els tipus varietals existents i poder així conservar, recuperar i promocionar les varietats locals de forma pertinent (Figàs et al., 2015a).

Als territoris valencians hi ha diversos grups d’investigació que han dut a terme diferents estudis per tal d’esbrinar i tipificar les varietats tradicionals de tomaca pròpies de cada zona (Taula 2). Per exemple, Domínguez (1998) en un estudi, després de la caracterització pertinent, parla de la tomaca “Mutxamel”, “Valenciana”, “ De Penjar” o de la tomaca “De Pebre”. També nomena d’altres molts tipus no tipificats com ara “De l’obrer” o “Ou de Bou”.

Per un altre costat, en altres estudis com ara el realitzat per Cebolla et al. (2013) i el treball realitzat per Figàs et al. (2015a) també parlen de les varietats “Valenciana”, “De Penjar” o “Mutxamel”. Aquests estudis han permès conèixer quines són les varietats més genuïnes del camp valencià, que tenen una implantació més forta i quina distribució presenten als distints territoris valencians.

Taula 2. Estudis de caracterització de varietats tradicionals de tomaca duts a terme a València. S’inclou el nombre d’entrades i la referència corresponent.

Comunitat Autònoma	Nombre d’entrades estudiades	Referència
València	8	Domínguez, 1998
València	103	Cebolla-Cornejo, 2005
València	16	García-Martínez et al., 2013
València	103	Cebolla-Cornejo et al., 2013
València	70	Figàs et al., 2015a
València	166	Cortés-Olmos et al., 2015
València	58	Cerdán, 2015

Com ja hem dit abans, la tasca de classificació i identificació no és gens fàcil, a més a més, aquest esforç es veu accentuat a causa de l’existència de varietats no estandarditzades i que reben noms dispars atenent a la forma, ús o procedència geogràfica. D’açò se’n fan ressò els estudis realitzats a València. Així, Cebolla et al. (2013), Figàs et al. (2015a) o Cerdán (2015) classifiquen certes entrades com tipus “Plana”, “Redona” o tipus “Cor”. Aquestes segons indiquen, presenten alguns trets morfològics característics però manquen d’una associació concreta a una àrea geogràfica o d’un nom propi genuí associat a unes característiques morfològiques, agronòmiques o de sabor inconfusible. No obstant això, aquestes varietats continuen presentant unes característiques de qualitat molt bones. És el cas de moltes entrades de tomaca plana roja o rosada presents a molt pobles i molt apreciades. De cara a posar en valor les varietats tradicionals valencianes, les primeres que cal tindre en compte són aquelles varietats amb més tradició i prestigi. Així doncs, les principals varietats tradicionals de tomaca, que es descriuen a continuació són: “De Borseta”, “Del Pebre”, “De Penjar”, “De Pruna”, “Mutxamel”, “Valenciana” (Cebolla, 2005; Cebolla et al., 2013; Figàs et al., 2015a i Cerdán, 2015).

1.3.1.1 TOMACA TIPUS “DE BORSETA”

Aquest tipus varietal és típic de les comarques del sud d’Alacant com ara al Baix Segura, la zona d’Oriola o Almoradí. Són tomaques amb tendència a ser confoses amb el tipus varietal “De Pruna” però amb trets característics com ara la forma lleugerament aperada cosa que fa que reben també el nom de “De la Pera” (Figura 2). És tracten de tomaques un poc allargades amb secció rectangular i que solen consumir-se quan comencen a canviar de color. Tenen dos o tres lòculs, separats per un gros envà. El pericarpí també és gros i es manté ferm durant molt de temps. Es tracta d’una varietat que té espatlla verda, una cicatriu peduncular petita i no solen presentar problemes d’esquerdat (Cebolla, 2005; Cebolla et al., 2013; Figàs et al., 2015a i Cerdán, 2015).

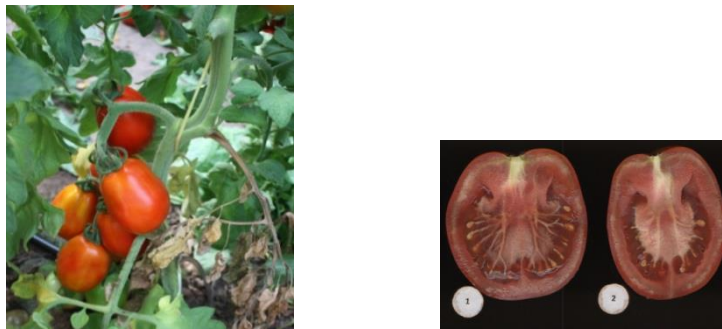


Figura 2. Imatge de fruits del tipus varietal “De Borseta”. A l’esquerra es veu una imatge d’un ramell en una planta, mentre que a la dreta es veu un tall longitudinal de dues tomaques.

1.3.1.2 TOMACA TIPUS “DEL PEBRE”

La tomaca tipus “Pebre” és el tipus més fàcilment identificable ja que es tracten de tomaques molt allargades que d’alguna manera recorden a un pebre “italià”. Aquest tipus varietal també presenta espatlles verdes persistents i freqüentment presenta un esquerdat radial moderat, que de vegades pot ser greu fent inviable la comercialització d’aquestes tomaques. (Figura 3). Tenen de dos a quatre lòculs difícils de diferenciar ja que moltes vegades les parets loculars acaben fusionant-se amb el pericarpí. Pot presentar buidat moderat de vegades. Es tracta d’una tomaca amb poques llavors la qual cosa pot comprometre la conservació d’aquest tipus varietal (Cebolla, 2005; Cebolla et al., 2013; Figàs et al., 2015a i Cerdán, 2015).



Figura 3. Imatges de fruits del tipus varietal “ Del pebre”. A l’esquerra es veu una imatge d’un ramell en una planta, mentre que a la dreta es veu un tall longitudinal de dues tomaques.

1.3.1.3 TOMACA TIPUS “DE PENJAR”

Aquest tipus de tomaca té una característica molt específica i és la seva llarga longevitat. Poden ser conservades durant molts mesos. En general presenten tomaques petites i rodones, amb pell transparent o groga (Figura 4). En el cas de les varietats amb pell transparent, la tomaca adquireix una tonalitat roja-groguenca i en el cas de tindre la pell groga, es queda en tonalitats ataronjades o roges. Tenen un pericarpí gros i dur i dos o tres lòculs normalment (Cebolla, 2005; Cebolla et al., 2013; Figàs et al., 2015a i Cerdán, 2015).

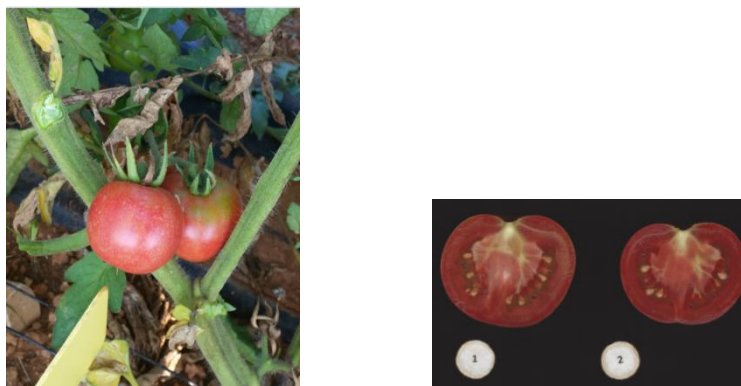


Figura 4. Imatge de fruits del tipus varietal “De Penjar”. A l’esquerra es veu una imatge d’un ramell en una planta, mentre que a la dreta es veu un tall longitudinal de dues tomaques.

1.3.1.4 TOMACA TIPUS “DE PRUNA”

Aquest tipus de tomaca és el que normalment s'utilitza per a cuinar o per a fer conserva. Són de forma oblonga, petits i fàcils de pelar. El problema amb estes varietats radica en que no és gens fàcil diferenciar les varietats actuals de les varietats tradicionals cosa que ha posat en perill aquest tipus de varietats tradicionals fins el punt que una gran quantitat de varietats d'aquest tipus s'hagen perdut (Figura 5) (Cebolla, 2005; Cebolla et al., 2013; Figàs et al., 2015a i Cerdán, 2015).

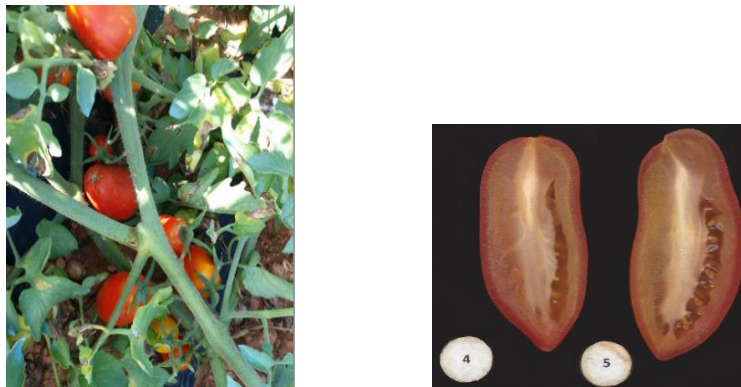


Figura 5. Imatge de fruits del tipus varietal “De Pruna”. A l'esquerra es veu una imatge d'un ramell en una planta, mentre que a la dreta es veu un tall longitudinal de dues tomaques.

1.3.1.5 TOMACA TIPUS “MUTXAMEL”

Aquest tipus de tomaca es troba principalment en zones Alacantines i és especialment identificable en la localitat de Mutxamel d'on rep el nom. Es tracta d'una tomaca aplanada, amb acostellat variable i amb presència persistent d'espallles verdes. Aquestes espallles verdes a mesura que va madurant el fruit, van difuminant-se i es barregen amb taronges i rojos que li donen una aparença molt cridanera. Aquestes tomaques presenten altres característiques clau com ara el gran nombre de lòculs que es distribueixen bastant regularment, alguns d'aquests de gran mida i un cor que ocupa la major part del fruit. Hi ha vegades que s'observen lòculs inclús dins del cor. Per un altre costat, el pericarpí sol ser gros i dur. La cicatriu peduncular és gran i amb una zona surosa. El fruit pot tindre un esquerdat moderat radial. El acostellat típic d'aquesta tomaca va lligat freqüentment a un lleuger buidat (Figura 6) (Cebolla, 2005; Cebolla et al., 2013; Figàs et al., 2015a i Cerdán, 2015).



Figura 6. Imatge de fruits del tipus varietal “Mutxamel”. A l’esquerra es veu una imatge d’un ramell en una planta, mentre que a la dreta es veu un tall longitudinal de dues tomaques.

1.3.1.6 TOMACA TIPUS “VALENCIANA”

Aquest tipus de tomaca té un conjunt de característiques molt específiques i identificables que permeten classificar-la com a tomaca valenciana. El problema ací radica en que l’adjectiu “Valenciana” s’ha utilitzat amb molta lleugeresa fora dels territoris valencians per a fer referència a qualsevol varietat originada als diferents territoris valencians. Però la realitat és que aquest tipus varietal és genuí de la denominada “Plana de València” que inclou les riberes dels rius Xúquer, Túria i Palància i molt específicament a la zona de l’horta de la ciutat de València.

Aquest tipus varietal presenta tres tipus de fruit en una mateixa planta. La principal forma de fruit és la tipus “masclet” i és la morfologia que identifica el tipus varietal. Consisteix en fruits amb forma de cor, que s’allarguen en la zona pistil·lar cosa que fa que tinguen una forma apuntada, típic d’aquesta varietat (Figura 7). Són els fruits que major preu poden arribar a tindre en el mercat.

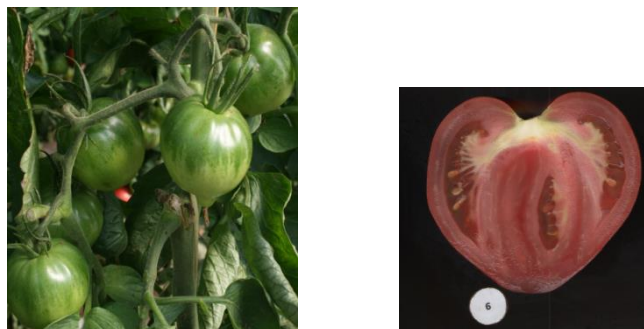


Figura 7. Imatge de fruites del tipus varietal “Valenciana” morfologia “Masclet”. A l’esquerra es veu una imatge d’un ramell en una planta, mentre que a la dreta es veu un tall longitudinal d’una tomaca.

El segon tipus de fruit que podem trobar en aquest tipus varietal és el tipus “femella”. Aquest consisteix en fruits lleugerament aplanats i en forma de cor, amb la regió pistil·lar indentada i amb cicatriu pistil·lar oberta (Figura 8). El fet de que no posseeixen la morfologia típica de tomaca valenciana fa que no tinguen preus tan elevats com el tipus masclet, tot i tindre les mateixes propietats nutricionals i organolèptiques.



Figura 8. Imatge de fruites del tipus varietal Valenciana, morfologia “Femella”. Imatge presa al Mercat Central de València.

Per últim, el tercer tipus de fruit que podem trobar es el tipus “rotllo”. Consisteix en tomaques aplanades, deformes i que solen produir-se a partir de la primera flor de cada ramell floral i que es desenvolupen irregularment a causa d’una fasciació de la flor. Açò sol ser especialment important en el primer ramell de la planta (Figura 9). Aquest tipus de tomaca, al tractar-se de tomaca valenciana, pot vendre’s en el mercat, cosa que en altres varietats seria impensable. Independentment de la morfologia del fruit, els fruits presenten espatlla verda persistent i són de color rogenc menys intens que les varietats comercials. En general tenen lòculs petits distribuïts de forma irregular al voltant del cor de secció circular i de gran mida. És freqüent trobar lòculs en l’interior del cor.



Figura 9. Imatge d’una fruita del tipus varietal “Valenciana” morfologia “Rotllo”.

1.4 POSADA EN VALOR DE LES VARIETATS TRADICIONALS

La tomaca és una espècie a la qual se li han dedicat molts esforços tant econòmics com científics pel que fa a la millora genètica vegetal. Tant ha sigut l'atenció que se li ha pres que a dia d'avui disposem en el mercat de nombroses varietats amb característiques excel·lents. Podem trobar varietats amb nombroses resistències, amb rendiments desorbitats així com varietats amb una gran capacitat d'adaptació a diferents ambients. No obstant, en els últims anys el consumidor ha canviat de gustos i ara busca tomaques amb propietats diferents. Es podria dir que el consumidor del segle XXI busca tomaques amb unes propietats organolèptiques i nutricionals superiors. És ací on les varietats tradicionals poden presentar-se com a una alternativa per a pal·liar aquesta necessitat del mercat. El principal problema el trobem en que la majoria d'aquestes varietats tenen un caràcter marcadament local la qual cosa fa que tinguen un risc molt elevat de desaparició. Cal destacar que moltes vegades la seua conservació depèn d'uns pocs agricultors que tenen l'agricultura com una alternativa però no com a mitjà de vida. Es este un dels principals motius que accentuen la potencial pèrdua d'aquests materials.

Per fer front a la desprotecció a què de vegades es veuen sotmeses les varietats tradicionals, el que s'ha de aconseguir és la posta en valor d'aquestes varietats per a que d'aquesta manera siguen atractives tant per a l'agricultor com per al consumidor. D'aquesta forma l'agricultor les cultivarà, i a través del seu cultiu les conservarà. Per a posar en valor les varietats tradicionals de tomaca, el primer que s'ha de fer és una caracterització tant agronòmica, morfològica, nutricional com sensorial dels materials prospectats al camp. En aquest sentit en diferents regions europees s'està apostant per les varietats tradicionals. Es generen així catàlegs de varietats locals com és el cas del País Basc (Fantova i Gómez, 2005), Aragó (Carravedo, 2006) o Canàries (Amador et al., 2012) entre d'altres. Així doncs, disposar d'aquesta informació ens permetrà fer-nos una idea global de la situació en una regió concreta per a poder focalitzar l'atenció i els recursos allà on les prospeccions siguen deficientes o inexistents i així poder identificar materials de tomaca tradicionals amb els quals dur a terme programes de valorització. Tot i això, hi ha diferents trets que entrebanquen la recuperació i promoció de les varietats tradicionals. Aquests són la menor producció i la incidència de malalties.

Pel que fa a la producció, els majors preus que poden arribar a tindre en el mercat fa que la venda de les varietats tradicionals compense la menor productivitat. No obstant això, com ja hem dit, les varietats tradicionals són de vegades heterogènies cosa que permetria dur a terme programes de selecció destinades a augmentar el rendiment en una determinada varietat tradicional.

Freqüentment s'ha qüestionat la competitivitat de les varietats tradicionals, atenent a la seua baixa productivitat i la falta d'adaptació a distints sistemes de cultiu moderns. La primera crítica és matisable, sobre tot si tenim en compte el millor preu de venda. La segona, en canvi, és totalment errònia, ja que moltes empreses valencianes estant produint tomaques de tipus "Valenciana" i "De Penjar", en cultiu a hivernacle i amb sistemes de degoteig, amb molt bona qualitat i molts bons resultats als mercats valencians i catalans (comunicació personal Jose

Herrero i José Herrera). Per últim, l'entrebanc més greu si cap és l'elevada susceptibilitat a malalties que presenten aquest tipus de varietats. Principalment presenten susceptibilitat a malalties d'origen fúngic i especialment a malalties d'etiologia viral (Soler et al., 2010). És per això que la realització de programes de millora per a la introducció de gens de resistència a malalties és una bona manera de valoritzar les varietats tradicionals i fer-les explotables comercialment, dit d'una altra manera, fer-les atractives per a l'agricultor.

1.4.1 VARIETATS TRADICIONALS COM A ALTERNATIVA RENTABLE

Si d'alguna manera es pot dur a terme la posta en valor d'una varietat tradicional, sens dubte la millor forma és plantejar-la com una alternativa rentable. A tot el territori espanyol existeixen diferents varietats tradicionals que s'estan presentant com a una altra opció de negoci. Algunes d'aquestes tenen ja inclòs el seu propi nínxol de mercat consolidat.

Si ens centrem en les varietats tradicionals de tomaca, existeixen diferents exemples de varietats que són amplament acceptades pels agricultors ja que han demostrat ser una bona elecció quant a rendibilitat econòmica es refereix. Per exemple a Aragó trobem el cas de la tomaca "Rosa de Barbastro" (Pascual i Lavilla, 2014). A Catalunya per exemple trobem la tomaca "Pera de Girona" (Casals J., 2012) o la tomaca "Montserrat" (Casals et al., 2010). Per un altre costat a València trobem diferents exemples com ara la tomaca "Valenciana d'El Perelló", la "Tomaca de Penjar d'Alcalà del Xivert", la tomaca "De la Pera" o la tomaca tipus "Mutxamel" (Figàs et al., 2015a). El tipus varietal "De penjar" (Figura 10) per exemple, presenta certes característiques que la fan atractiva i motiu pel qual s'ha consolidat com a alternativa rentable per als agricultors valencians. El fet de tractar-se de tomaques amb una llarga vida postcollita junt amb l'elaboració artesanal i les peculiaritats úniques tant geològiques com climatològiques del terme d'Alcalà del Xivert, ha aconseguit diferenciar aquest producte de la resta dels que es produeixen en el nostre país.



Figura 10. Tomaca de Penjar. Presentació al consumidor d'un ramell.

Un altre cas una mica diferent és el de la tomaca tipus “Mutxamel” (Figura 6) o la tomaca “ De la Pera” (Figura 2). Aquestes són varietats molt apreciades al territori valencià d’Alacant i la Comunitat Autònoma de Múrcia pels seus atributs organolèptics però tenen un greu problema, i és el que anteriorment hem mencionat, l’alta susceptibilitat a virosis. Així, els agricultors es mostren reticents a cultivar-les per aquest problema. En aquest sentit, La Universitat Miguel Hernández en 1998 va començar un programa de millora per a la introducció dels tres gens de resistència que fan front a les tres virosis més importants que afecten a la tomaca. Aquestes virosis són les causades per: el virus del mosaic de la tomaca (*Tomato mosaic virus, ToMV*), el virus del rissat groc de la tomaca (*Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV*) i el virus del bronzejat de la tomaca (*Tomato spotted wilt virus, TSWV*). Aquest grup mitjançant la millora assistida per marcadors moleculars ha aconseguit obtenir línies que presenten resistències a cadascuna de estes virosis tant en la tomaca tipus “Mutxamel” com el tipus “De la Pera”(García et al., 2015; López, 2015).

1.4.2 LA TOMACA “VALENCIANA” COM A ALTERNATIVA RENTABLE

1.4.2.1 CARACTERÍSTIQUES GENERALS

Sens dubte, la tomaca “Valenciana” es una varietat tradicional que compleix els requisits per a consolidar-se com a producte de qualitat excepcional. Aquesta posseeix un conjunt de trets que la converteixen en una tomaca amb una gran qualitat interna i una aparença externa singular. A més a més, aquest tipus de tomaca es pot collir en estat pintó sense que això afecte a la maduració del fruit i que arribe a atènyer els atributs organolèptics desitjats. Això permet comercialitzar aquesta tomaca en zones allunyades de València com a Barcelona, Saragossa o Madrid. Tot açò està permetent que any rere any aquest tipus de tomaca assolisca preus de venda raonables si comparem amb els preus de les tomaques comercials (Figura 11). De fet, ja existeixen diverses associacions de productors com ara la Cooperativa Unió Protectora del Perelló que des d’uns anys cap ací han apostat per l’autogestió i explotació comercial de la tomaca tipus varietal “Valenciana” per a així ser sobirans de la producció, comercialització i fixació de preus de la tomaca que comercialitzen com “Valenciana d’El Perelló”. Així doncs, aquesta tomaca s’està consolidant com a alternativa rentable per a molts agricultors de la comarca valenciana de la Ribera Baixa.



Figura 11. Tomaca “Valenciana d’El Perelló” a un supermercat valencià

Malgrat tot açò, com ocorria amb la tomaca tipus “Mutxamel” o “De la Pera”, la tomaca “Valenciana d’El Perelló” és altament susceptible a diferents malalties; sent les malalties causades per virus les que majors pèrdues generen als agricultors. A València concretament un del virus que major incidència té i que més estralls causa a la producció és el Virus del Mosaic de Tomaca (*ToMV*). Aquest fet juntament amb l’elevada susceptibilitat que presenta la tomaca valenciana fa que hi hagen greus pèrdues de producció. Això a la vegada fa que molts agricultors es plantegen abandonar el cultiu de tomaca tradicional o ni tan sols plantejar-se el cultiu d’aquesta. És per això que per a donar valor a aquest tipus de varietats, no sols s’ha de dur a terme la selecció agronòmica dels materials disponibles sinó que s’ha de dur a terme la millora front a malalties que posen en perill la producció. Així, la incorporació de gens de resistència en les varietats tradicionals permetran estimular el cultiu d’aquest tipus de varietats i popularitzar el seu consum.

1.4.2.2 IMPORTÀNCIA ECONÒMICA

Com ja hem dit anteriorment els majors preus que poden arribar a tindre en el mercat, fa que la venta de les varietats de tomaca “valenciana” compense la menor productivitat que assoleixen. En aquest sentit la Cooperativa Unió Protectora del Perelló cada any bat rècords de producció i actualment obté una producció mitjana anual al voltant de 800.000 Kg de tomaca “Valenciana d’El Perelló”. Un altre fet que cal tindre en compte és que el llaurador rep 1,5-1,8 € per Kg de tomaca produïda (El Mundo, 2013), mentre que el preu de la tomaca comercial millorada oscil·la entre 0,30 i 0,6 €/ Kg. Aquest preu fa que la manca de productivitat siga compensada pels preus raonables que obté. Cal destacar doncs que una producció anual d’aquestes magnituds està generant entre 1,2 i 1,44 milions d’Euros per als llauradors mentre que si es tractara de tomaca comercial millorada, la mateixa producció estaria generant al voltant de 240.000 i 480.000 Euros.

1.4.2.3 POSTA EN VALOR DE LA TOMACA TIPUS “VALENCIANA”

Amb la tomaca “Valenciana” les xifres justifiquen la rendibilitat d’aquests tipus de varietats. És obvi doncs, que el cultiu de tomaca “Valenciana” s’està consolidant com a alternativa rentable per als llauradors plantejant-se així com a cultiu prometedor amb un potencial de comercialització lluny d’haver-se explotat al màxim. Tot hi això, com ja hem dit abans aquest tipus varietal és altament susceptible a diferents malalties sent a València el Virus del Mosaic de Tomaca (*ToMV*) el principal problema. Per un altre costat la falta d’uniformitat i quallat fan que de vegades els llauradors tinguen problemes a l’hora de comercialitzar la seua tomaca com a “Valenciana”. És per això que són necessaris programes tant de selecció com de millora per a posar en valor aquestes varietats.

1.4.2.3.1 POSADA EN VALOR A TRAVÉS DE LA “SELECCIÓ”

Una forma de posar en valor les varietats tradicionals és sotmetent-les a programes de selecció per a augmentar la uniformitat de producció així com altres característiques importants. En el cas de la tomaca “Valenciana” és interessant sotmetre aquest tipus varietal a programes de selecció per a augmentar la uniformitat així com el quallat i altres trets morfològics del fruit característics com ara el apuntat, la presència d’espalla, la presència de ratlles verdes i la mida del fruit. És per això que la selecció agronòmica dels materials disponibles és una manera molt apropiada de valoritzar aquest tipus de varietats, en harmonia i coordinació amb les demandes dels agricultors.

1.4.2.3.2 POSADA EN VALOR A TRAVÉS DE LA “MILLORA”

Una altra forma per a donar valor a aquest tipus de varietats és mitjançant la millora front a malalties que posen en perill la producció. Així, la incorporació de gens de resistència en les varietats tradicionals permetran estimular el cultiu d’aquest tipus de varietats i popularitzar el seu consum. Com hem mencionat anteriorment a València el principal problema que trobem és la presència del Virus del Mosaic de Tomaca (*ToMV*). Aquest és un virus del gènere *Tobamovirus* amb un genoma de tipus (+)ssRNA i que afecta principalment a varietats tradicionals o autòctones de tomaca i de pebre però que també pot afectar a altres espècies de la família de les Solanàcies així com a *Aizoaceae*, *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae* o *Scrophulariaceae* (MAGRAMA). Aquest virus es transmet per contacte, de forma mecànica amb les tasques de cultiu, empelts, fregament amb roba, ferramentes, calçat etc. A més a més, és capaç de transmetre’s per llavor en el perisperma i l’endosperma. Per un altre costat la simptomatologia varia depenent de la raça o l’aïllat així com del cultivar a què afecte, el moment de la infecció i les condicions ambientals. Però bàsicament observem mosaic verd amb deformacions de fulla i reducció en el vigor de la planta, mosaic groc o necrosi de la tija, pecíol, fulles i fruits. Els fruits presenten taques obscures i necrosi interna.

Al tractar-se d’un virus que es transmet amb tanta facilitat, la millor forma de fer-li front és mitjançant la introducció de gens de resistència a les varietats que es cultiven allà on aquest virus causa problemes greus en la producció. Hi ha diversos factors de resistència que atorguen resistència front al *ToMV* com ara el factor *Tm-1*, *Tm-2* i *Tm-2²*. Aquest últim és el que més s’ha emprat i segueix emprant-se en millora genètica de tomaca ja que és capaç de conferir resistència més efectiva al *ToMV* (Hall, 1980). D’aquesta manera, la introducció del factor de resistència *Tm-2²* a la tomaca “Valenciana” és una manera molt interessant de valoritzar aquest cultiu i fer-lo atractiu per al llaurador. En este sentit el present treball es mostra com a una solució i potenciació del cultiu de tomaca tradicional tipus “Valenciana” mitjançant la introducció del gen de resistència *Tm-2²*.

2. OBJECTIUS

La selecció per a augmentar la uniformitat així com la introducció de factors de resistència a la tomaca “Valenciana” són dos abordatges molt interessants per a valoritzar aquest cultiu. En concret per a valoritzar la varietat de tomaca “Valenciana”, “Tomata Valenciana d’El Perelló” es plantegen els següents objectius:

1.- Selecció per a uniformitat de característiques morfològiques i agronòmiques a partir de 2 seleccions massals de tomaca del tipus “ Valenciana” (COOP-767 i COOP-886) procedents de la Cooperativa Unió Protectora del Perelló.

2.- Millora de la resistència al *ToMV* de la “Tomata Valenciana d’El Perelló” mitjançant la introducció del gen *Tm2²*.

3. MATERIAL I MÈTODES

3.1 MATERIAL VEGETAL

3.1.1 EN EL PROGRAMA DE SELECCIÓ

En aquest treball es va partir de 95 plantes de cadascuna de les dos 2 seleccions massals de tomaca del tipus “ Valenciana” (COOP-767 i COOP-886) procedents de Cooperativa Unió Protectora del Perelló. El primer cicle de cultiu es van seleccionar 11 plantes de la selecció COOP-767 (COOP-767 22, 27, 38, 44, 50, 53, 54, 57, 63, 68 i 89) i 5 plantes de la selecció COOP-886 (COOP-886 41, 42, 54, 55 i 81) que es van autofecundar per a constituir les mares del següent cicle en el programa de retrocreuaments.

El nombre de plantes procedents de l'autofecundació de les plantes seleccionades dels materials inicials (COOP-767 i COOP-886) fou de 32. D'aquestes, es van seleccionar les plantes fenotípicament millors i es van autofecundar per a constituir les mares del següent retrocreuament.

El nombre de plantes procedents de l'Autofecundació de les plantes seleccionades en el següent cicle fou 20. D'aquestes, es van seleccionar les plantes fenotípicament millors i es van autofecundar per a constituir les mares del següent retrocreuament.

Actualment es disposa en el camp de 20 plantes procedents de l'autofecundació de cadascuna de les plantes seleccionades el cicle anterior i s'estan realitzant els creuaments pertanyents per a l'obtenció del RC3.

3.1.2 EN EL PROGRAMA DE RETROCREUAMENTS

Per al programa de retrocreuaments es va partir de les 95 plantes de cadascuna de les dos 2 seleccions COOP-767 i COOP-886 esmentades anteriorment així com de 20 plantes de l'híbrid comercial “Euphrates” (Syngenta) a partir de les quals es duria a terme el programa de retrocreuaments. Les plantes de COOP-767 i COOP-886 seleccionades (COOP-767 22, 27, 38, 44, 50, 53, 54, 57, 63, 68 i 89; COOP-886 41, 42, 54, 55 i 81) foren utilitzades com a mares del creuament inicial (C1), al ser pol·linitzades amb pol·len del parental donant de la resistència al *ToMV* (Euphrates).

3.2 DESINFECCIÓ DE LLAVORS I REALITZACIÓ DE PLANTERS

Amb la finalitat de reduir al màxim l'aparició de malalties ocasionades per transmissió de malalties per llavor es va dur a terme la desinfecció d'aquestes en cada cicle de cultiu. La desinfecció consistia en submergir les llavors en una solució de trifosfat de sodi (TSP) ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) al 10% durant 3 hores. Posteriorment es realitzaven 3 llavats amb aigua destil·lada de 15 minuts cada llavat. El pas següent consistia en sotmetre les llavors a un tractament amb hipoclorit sòdic (lleixiu comercial) al 30% durant 1 hora. Després d'açò es realitzava 1 llavat amb abundant aigua destil·lada. Les llavors es deixaven eixugar en paper de filtre. Quan les llavors estaven completament eixugades, cosa que comprovàvem mitjançant

l'ús de SilicaGel, es sotmetien a un procés de termoteràpia que consistia en un tractament de 80°C durant 24h en una estufa (Figura 12).



Figura 12. Procés de desinfecció de llavor. A la imatge de l'esquerra s'observen els diferents llavats. A la imatge central es veu com amb el SilicaGel es comprova el nivell d'humitat de la llavor. A la imatge de la dreta es mostra l'estufa on es fan els tractaments tèrmics.

Per un altre costat, una vegada les llavors havien passat pel tractament de desinfecció, es portaven a un viver comercial on es preparaven els planters en safates de poliestirè amb alvèols per a 104 plàntules. Una vegada es disposaven de les plàntules amb 8 fulles desenvolupades, la qual cosa ocorria unes 5-6 setmanes després de la sembra aproximadament (Febrer-Març) o unes 4 setmanes (Agost), es portaven les plàntules als hivernacles de la Cooperativa Valenciana Unió Protectora d'El Perelló.

3.3 CONDICIONS DE CULTIUS

Cada cicle de cultiu es duia a terme en hivernacles pertanyents a la Cooperativa Valenciana Unió Protectora d'El Perelló. Aquests es troben en El Perelló, un poble que pertany a la comarca de la Ribera Baixa i que es troba a prop del Parc Natural de l'Albufera.

En el moment inicial es posaren 95 plantes de cadascuna de les 2 seleccions així 20 plantes de l'híbrid comercial a una distància de 0.40 m entre cada planta i 1.25 m entre fila. El nombre de plantes i files a partir del segon cicle variarien depenent de la procedència de la planta, és a dir, depenent si procedien de la autofecundació de plantes seleccionades com a fenotípicament millor o plantes procedents de retro-creuament. Aquesta informació s'especificarà adequadament en l'apartat 3.5. Per un altre costat, la temperatura a l'hivernacle oscil·lava entre els 12.5°C i els 32.7°C.

El reg es realitzava mitjançant un sistema de degoteig i amb una freqüència depenent de la necessitat de les plantes en cada moment. Cal destacar que el primer reg, és a dir, l'immediat després del transplantament consistia en un reg de la parcel·la a manta.

El sòl tenia una textura sorra-argilosa. Aquest sòl, segons la USDA (United States Department of Agriculture), presenta partícules d'argila menors a 0.002 mm (8.85%), llims amb una mida entre 0.02 i 0.05 mm (5%) i la resta de sorra de 0.05 a 2 mm de mida (86.15%). Té un contingut en matèria orgànica del 2.3% i un pH de 8.11. La conductivitat del sòl és de 0.35 dS/m.

Les característiques d'aquest sòl fan que una fertilització addicional siga necessària. En aquest sentit, les fertilitzacions d'aquest sòl foren mitjançant l'ús de N, P₂O₅ i K₂O amb una quantitat de 220 Kg/ha, 50 Kg/ha i 280Kg/ha respectivament. I les males herbes s'arrancaven a mà i el tractament de fitosanitaris s'utilitzava quan era necessari.

3.4 REALITZACIÓ DE CREUAMENTS

3.4.1 RECOL·LECCIÓ DE POL·LEN DEL PARENTAL MASCULÓ

Per a dur a terme els creuaments pertinents es va recol·lectar pol·len de flors madures emprant una placa petri de plàstic i unes pinces metàl·liques esterilitzades. D'aquesta manera colpejant la flor sobre la placa petri es desprenia el pol·len que posteriorment es va utilitzar per a realitzar els creuaments dirigits (Figura 13).



Figura 13. Procés de recol·lecció de pol·len. A l'esquerra es veu la flor madura de la qual s'extrau el pol·len. A la imatge central es mostra com colpejant es desprèn el pol·len. A la imatge de la dreta s'observa la placa petri amb el pol·len preparat per a ser utilitzat.

3.4.2 EMASCULACIÓ I POL·LINITZACIÓ DE LES FLORS DEL PARENTAL FEMENÍ

Les flors que actuaven com a femenines havien de ser emasculades, és a dir, s'havia d'eliminar l'androceu de la flor abans que el gineceu fóra receptiu per a així assegurar el creuament dirigit i evitar l'autopol·linització. Es van elegir flors immadures per a realitzar els creuaments. A aquestes flors se'ls va eliminar el con d'anteres emprant unes pinces metàl·liques i amb cura per a no danyar l'ovari i l'estil de la flor. A continuació es fregava la placa petri amb l'estigma de la flor i posteriorment es cobria la flor amb una bossa de paper i s'indicava el creuament i el dia en què s'havia realitzat (Figura 14).



Figura 14. Procés d'emasculació i pol·linització de la flor del parental femení. A l'esquerra es veu una flor ja emasculada on es preserva només la part femenina de la flor. A la imatge del centre es mostra com es du a terme la pol·linització. A la imatge de la dreta es mostra com es protegeixen les flors acabades de pol·linitzar per a assegurar el creuament desitjat.

3.5 DESCRIPCIÓ DEL PROGRAMA DE MILLORA REALITZAT

3.5.1 EN EL PROGRAMA DE "SELECCIÓ"

Per a dur a terme aquest programa de selecció es va aplicar la "Selecció individual en varietats heterogènies", en el qual a partir de dues seleccions massals (COOP 767 i COOP 886) es van realitzar seleccions en les successives generacions d'autofecundació. Cadascun dels individus seleccionats el primer cicle de cultiu es van convertir en progenitors d'una família en la pròxima generació a partir de la qual es va elegir el millor individu de cada família. Aquest individu seleccionat en aquesta generació a la vegada es va convertir en el progenitor d'una nova família en la següent generació. D'aquesta manera el procés es va repetir durant 4 cicles de cultiu (Figura 15).

3.5.2 EN EL PROGRAMA DE "RETROCREUAMENTS"

Per a dur a terme el programa de retrocreuaments es va partir de l'híbrid "Euphrates", el qual va actuar com a parental donador, i de les plantes seleccionades de COOP 767 i COOP 886 com s'indica a l'apartat 3.5.1. El primer cicle de cultiu (Abril-Juny 2014) es van realitzar els creuaments entre aquestes plantes seleccionades i "Euphrates" per a generar el creuament inicial (C1). Al segon cicle (Abril-Juny 2015) es va dur a terme el primer retrocreuament (RC1) emprant com a mares les plantes procedents de l'autofecundació de les plantes seleccionades el primer cicle de cultiu. Com a pares es van utilitzar només aquells individus C1 heterozigots portadors de l'al·lel de resistència ($Tm2^2$). Per a identificar aquests individus es va emprar un marcador molecular associat a l'al·lel de resistència com s'indica a l'apartat 3.6. Cal destacar que, per a assegurar el següent cicle, els retrocreuaments no només es van fer sobre els individus seleccionats en el programa de selecció (3.5.1) sinó també sobre aquells individus que més flors presentaven. A més a més, també es va fer una selecció d'aquells individus heterozigots procedents del RC1 i RC2, que sent heterozigots, eren fenotípicament més semblants a la "Tomaca Valenciana d'El Perelló". Per a dur a terme aquesta selecció es van seguir els següents criteris: "Aparença Valenciana" (0=Euphrates, 10= Valenciana), "Espatlla" (Baixa intensitat/Alta intensitat), "Forma apuntada del fruit" (Baixa intensitat/Alta intensitat), "Acostellat del fruit" (Baixa intensitat/Alta intensitat), "Quallat" (Baix/Alt).

D'aquesta manera, es va repetir el mateix procés de selecció i creuaments, realitzant el RC2 el cicle tercer (Setembre-Desembre 2015) i el RC3 el cicle quart (Abril- Juny 2016) (Figura 16 i 17).

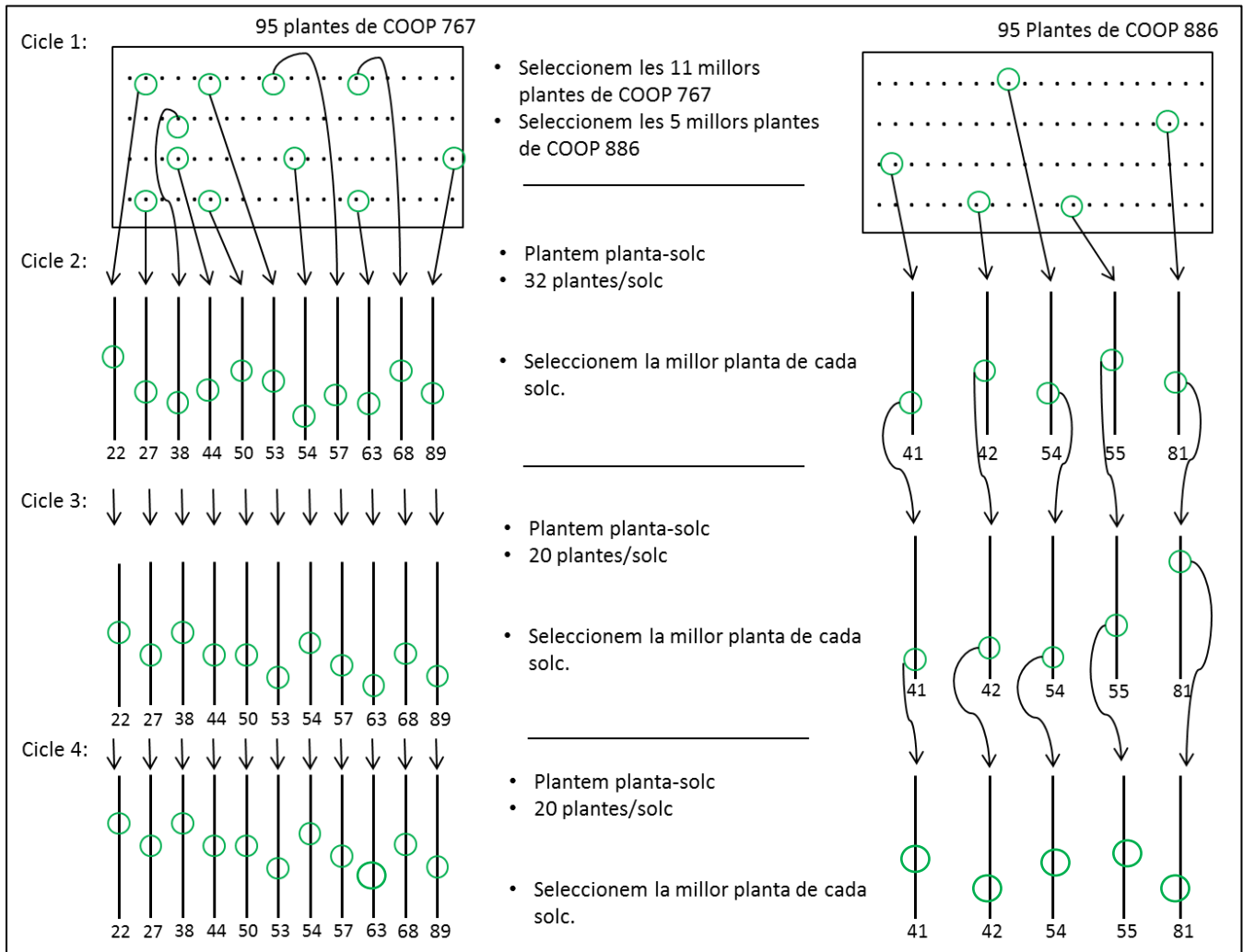


Figura 15. Esquema del programa de selecció utilitzat. Els cercles verds indiquen quina planta s'ha seleccionat i per tant serà progenitora d'una nova família en el següent cicle. Les línies rectes paral·leles representen solcs composts per un nombre diferent de plantes depenent de l'any que ens trobem. Les fletxes indiquen que es conserva la identitat de cada llinatge.

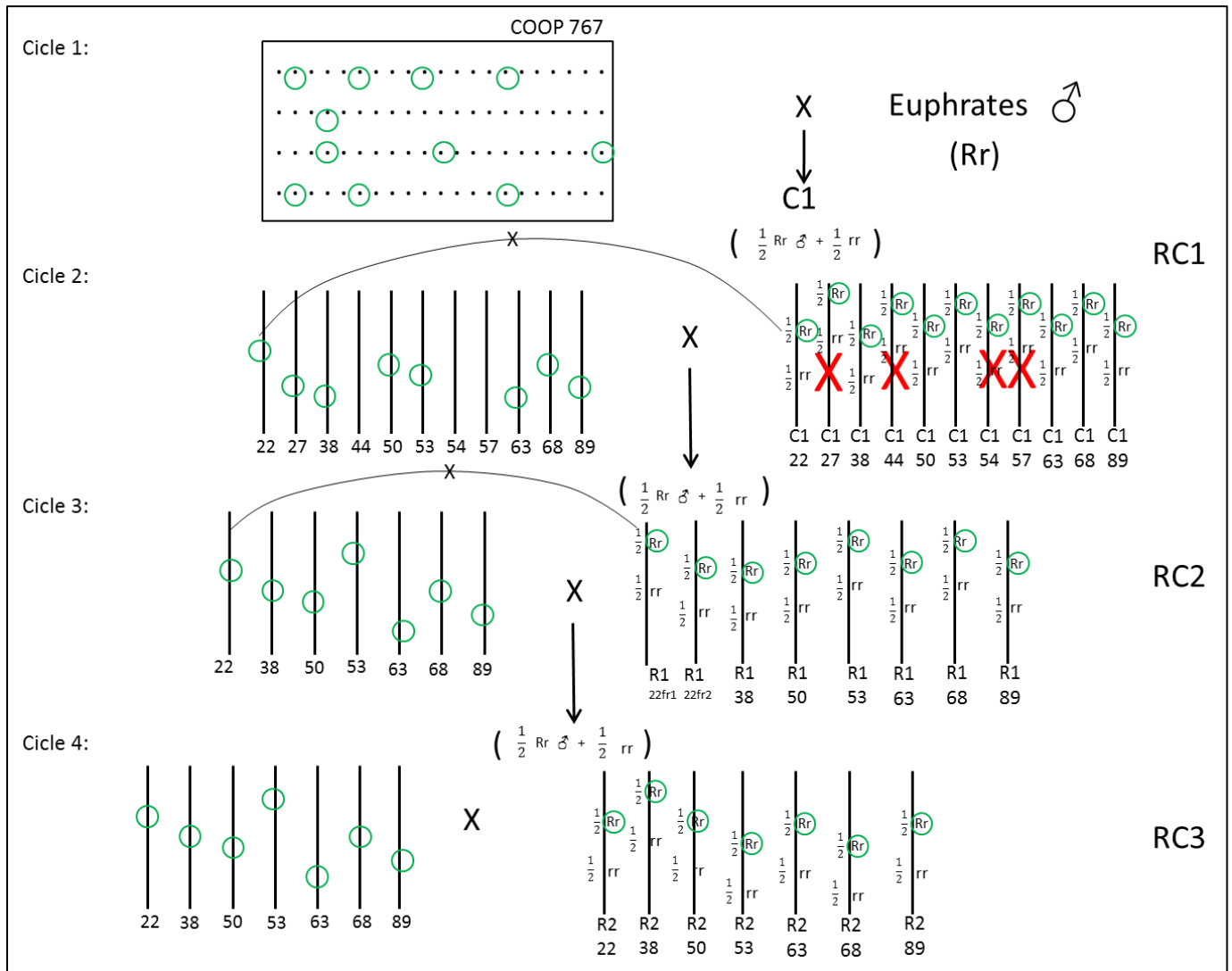


Figura 16. Esquema del programa de retrocreuaments a partir de la selecció massal COOP 767. Els cercles verds indiquen quina planta s’ha seleccionat. Les creus roges fan referència als llinatges de retrocreuaments que s’han perdut. Les línies rectes paral·leles representen solcs composts per un nombre diferent de plantes depenent de l’any i el llinatge en el qual trobem. Els retrocreuaments es fan respectant els llinatges, és a dir, les plantes heterozigòtiques procedents del C1 es creuen en les plantes procedents d’autofecundació del llinatge corresponent. Per exemple les plantes heterozigòtiques C1-22 es creuran amb plantes 22 procedents de l’autofecundació de la planta 22 seleccionada l’any anterior.

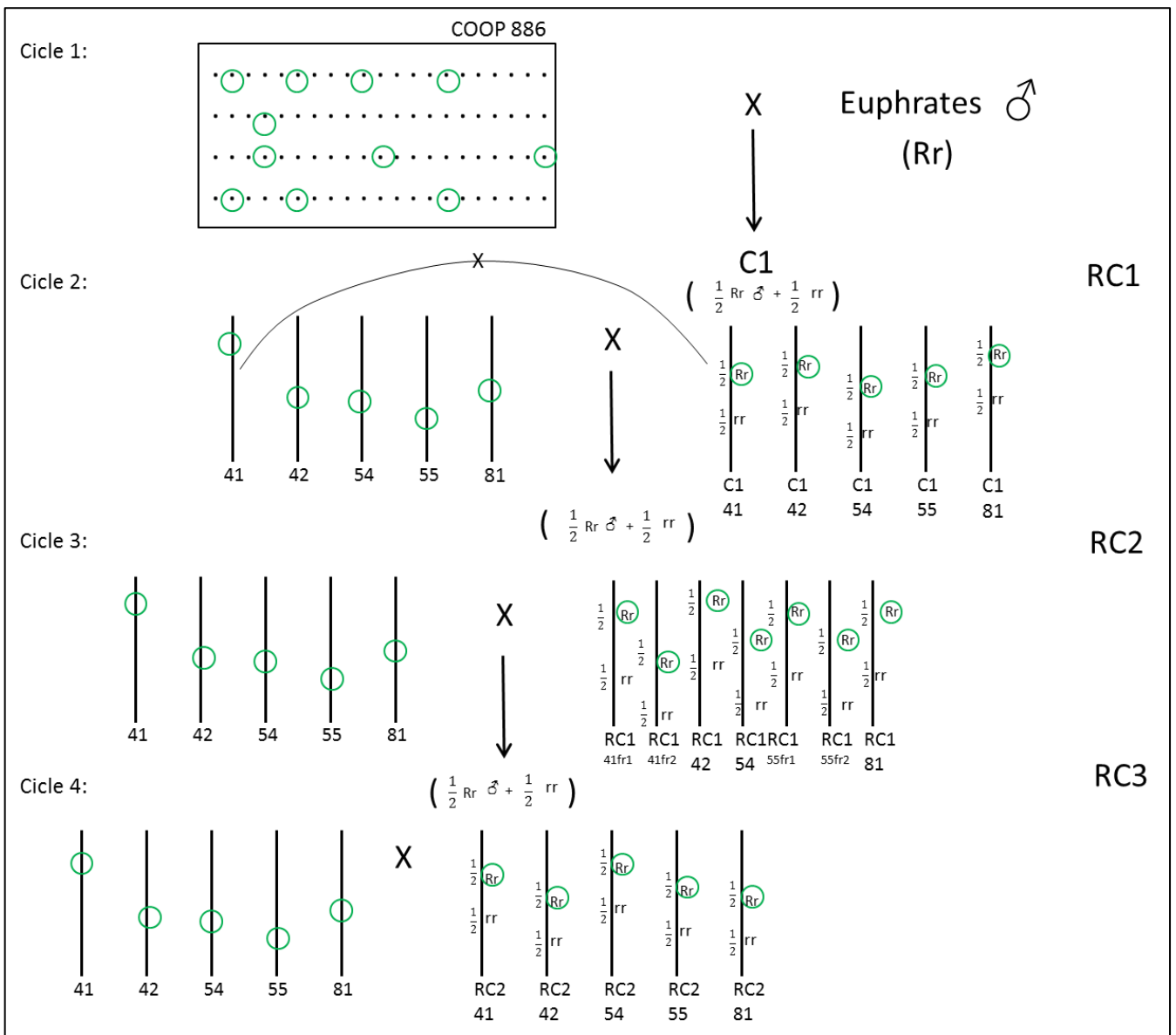


Figura 17. Esquema del programa de retrocreuaments a partir de la selecció massal COOP 886. Els cercles verds indiquen quina planta s'ha seleccionat. Les línies rectes paral·leles representen solcs composts per un nombre diferent de plantes depenent de l'any i el llinatge en el qual ens trobem. Els retrocreuaments es fan respectant els llinatges, és a dir, les plantes heterozigòtiques procedents del C1 es creuen en les plantes procedents d'autofecundació del llinatge corresponent. Per exemple les plantes heterozigòtiques C1-41 es creuaran amb plantes 41 procedents de l'autofecundació de la planta 41 seleccionada inicialment.

3.6 MARCADOR MOLECULAR ASSOCIAT AL GEN DE RESISTÈNCIA *Tm2²*

Els marcadors SNPs han sorgit recentment com a uns dels marcadors moleculars més prometedors que existeixen. En aquest treball es va emprar un marcador SNP per a realitzar el genotipat d'aquelles plantes procedents del C1, RC1 i RC2. Per a poder dur a terme el programa de retrocreuaments mitjançant la selecció assistida per marcadors ens vam basar en la publicació de Shi et al., (2011) i amb dos seqüències disponibles en "GenBank" (FJ817600.1 i FJ817602.1) corresponents a l'al·lel susceptible "*tm2*" i a l'al·lel resistent "*Tm2²*" per a desenvolupar encebadors que ens permeteren identificar els SNPs associats a l'al·lel susceptible i l'al·lel resistent. D'aquesta manera érem capaços de discernir aquelles plantes heterozigòtiques (C/T) portadores de l'al·lel dominant *Tm2²* que confereix resistència al virus del *ToMV* d'aquelles susceptibles (C/C).

3.7 DISSENY D'ENCEBADORS

A partir de la informació proporcionada per (Shi et. al, 2011) es van desenvolupar encebadors mitjançant l'ús del programa "Primer 3" (Untergasser et al., 2012), fixant com a encebadors òptims aquells amb una temperatura d'annealing (*T_m*) de 60°C i una mida de 20 parells de bases (bp). Es va restringir la mida de l'amplicó a 90-150 bp ja que per a l'anàlisi d'SNPs mitjançant "High Resolution Melting" (HRM) es requereixen fragments com més petits millors. A la Taula 3 es mostren els encebadors emprats.

Taula 3. Encebadors emprats per a dur a terme el genotipat per al gen *Tm2²*

CODI	Seqüència d'encebador (5' → 3')
SNP <i>Tm2-2-F</i>	CAAGCATGTAACAGTTGCTTTTC
SNP <i>Tm2-2-R</i>	CAGGTATCCACATCAAGGTTTG

3.8 EXTRACCIÓ D'ADN

L'ADN genòmic es va extraure a partir de fulles joves dels individus a genotipar. De cadascuna de les plantes es van prendre aproximadament 75 mg de teixit vegetal. El protocol seguit per a l'obtenció del material genòmic va ser el mètode CTAB (Doyle, 1987). La quantificació de l'ADN es va realitzar amb un espectrofotòmetre Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE) i la qualitat de l'ADN es va avaluar mitjançant les relacions d'absorbància a 260/280 nm i 260/230 nm. L'anàlisi d'integritat de l'ADN es va realitzar mitjançant electroforesi en gel d'agarosa al 0,8%, utilitzant tinció amb GelRed i revelat amb llum UV en un analitzador d'imatges Gel Doc (BioRad) mitjançant el software Quantity One (BioRad).

3.9 ANÀLISI D'SNPS MITJANÇANT "HIGH RESOLUTION MELTING"

Per a efectuar el genotipat de les plantes es va dur a terme un anàlisi d'SNPs mitjançant la tècnica del "High Resolution Melting". L'instrument que es va utilitzar va ser el LightCycler 480 (Roche). El Mix de reacció va consistir en MgCl₂ 1.8 mM; encebadors directe i revers (SNP Tm2-2-F i SNP Tm2-2-R) a 0.3µM, MàsterMix 1X (Kit LightCycler 480 High Resolution Melting Master, Roche), 60ng d'ADN i aigua fins completar un volum final de reacció de 10 µM. Les condicions de reacció van consistir en una primera etapa de preincubació a 95°C durant 10 minuts; Una segona etapa d'amplificació constituïda per 55 cicles d'amplificació a 95°C 10 s, 55°C durant 15 s i 72°C durant 15 s; Una tercera etapa de fusió a 95°C durant 1 minut, 40°C durant 1 minut i 60°C durant 1 s seguit d'una rampa de temperatura on es va partir de 60°C i es va augmentar la temperatura fins a 95°C incrementant la temperatura 0.02 °C per segon. Per últim una quarta etapa de refredament de 10 minuts a 40°C. Finalitzada la reacció d'amplificació, l'amplificació era avaluada emprant el software "LightCycler 480 Software 1.5" mitjançant dos anàlisis: "Tm calling" i "Gene scanning". A través del primer anàlisi es verificava l'absència d'amplificacions inespecífiques. Mitjançant el segon anàlisi es verificava el control negatiu i les corbes de fusió eren normalitzades a través dels paràmetres "melt slider" i "threshold" per a l'òptima diferenciació dels genotips. D'aquesta manera érem capaços de diferenciar les plantes homozigòtiques recessives ($tm2^2tm2^2$) o (C/C) d'aquelles heterozigòtiques ($Tm2^2 tm2^2$) o (C/T) les quals ens interessaven per a seguir amb el programa de retro-creuaments.

3.10 INOCULACIÓ MECÀNICA DE *ToMV* PER A VALIDAR LA RESISTÈNCIA

3.10.1 PREPARACIÓ DE L'INÒCUL I INOCULACIÓ

En cada cicle de cultiu es va dur a terme un petit assaig per a validar la resistència d'aquelles plantes portadores de l'al·lel de resistència " $Tm2^2$ ". El mètode de preparació de l'inòcul i inoculació va consistir en triturar el teixit vegetal amb *ToMV* procedent del "Groupe d'Etude et de contrôle des Variétés Et des Semences" (GEVES). A continuació la pasta obtinguda es va filtrar a través d'un teixit de muselina i es va recollir el filtrat en un got de precipitat. L'extracte obtingut es va diluir en aigua destil·lada en una proporció 1:10 (pes : volum) i es va mantenir en un ambient refrigerat per a evitar la degradació del virus. A l'inòcul se li va incorporar l'agent abrasiu carborúndum de tamís ASTM nº 600 a l'1% i carbó actiu a l'1%.

A partir de les plantes portadores de l'al·lel de resistència " $Tm2^2$ ", es van obtenir esqueixos. Aquests, una volta arrelats varen ser inoculats de forma mecànica mitjançant un aplicador de cotó. L'inòcul es va distribuir per tota la superfície foliar. El procés de preparació d'inòcul i inoculació es va repetir uns 7-15 dies després per a prevenir possibles escapes.

3.10.2 ANÀLISI SEROLÒGIC DE LES MOSTRES

Es van prendre mostres de les fulles apicals no inoculades de cada planta als 15, 30 i 45 dies. Les mostres es van analitzar mitjançant la tècnica "Double Antibody Sandwich-Enzyme linked Immunosorbent Assay" (DAS-ELISA), seguint el protocol de (Clark i Adams, 1977) amb modificacions especificades pels proveïdors dels anticossos (Loewe biochemica).

L'absorbància de la reacció DAS-ELISA va ser mesurada a 405 nm en un fotòmetre "Microplate Reader Model 550" (BioRad Laboratories, Hercules, EEUU). Aquest paràmetre es va considerar una mesura relativa de l'acumulació viral (Ding et al., 1995). Es considerava que la mostra era positiva, és a dir, que hi havia presència del virus quan l'absorbància era major que la mitjana de les absorbàncies de les respectives plantes control més tres vegades la seva desviació típica.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1 GENERACIONS OBTINGUDES

4.1.1 PROGRAMA DE “SELECCIÓ”

De les 95 plantes de cadascuna de les dos 2 seleccions massals (COOP-767 i COOP-886) de les quals es va partir, es van seleccionar 11 plantes de la selecció COOP-767 (COOP-767 22, 27, 38, 44, 50, 53, 54, 57, 63, 68 i 89) i 5 plantes de la selecció COOP-886 (COOP-886 41, 42, 54, 55 i 81) que es van autofecundar per a constituir les mares del següent cicle en el programa de retrocreuaments. En el següent cicle (Abril-Juny 2015) es va repetir el procés, és a dir, es van seleccionar les millors plantes de cada llinatge i es va recollir llavor d'autofecundació per a poder així generar les mares del següent cicle en el programa de Retrocreuaments. Aquest procés es va repetir cicle rere cicle i actualment es disposa de la quarta generació d'autofecundació d'aquells llinatges seleccionats (Taula 4).

Taula 4. Característiques morfològiques dels llinatges seleccionats en el programa de selecció. Espatlla (BI=Baixa intensitat, MI= Mitjana intensitat, AI= Alta intensitat), Forma apuntada (BI=Baixa intensitat, MI= Mitjana intensitat, AI= Alta intensitat), Acostellat (BI=Baixa intensitat, MI= Mitjana intensitat, AI= Alta intensitat) i Quallat (A=Alt, M=Mitjà, B=Baix).

Selecció	Espatlla	Forma apuntada	Acostellat	Quallat
COOP 767-22	MI	MI	BI	M
COOP 767-27	AI	AI	BI	M
COOP 767-38	MI	MI	BI	M
COOP 767-50	AI	MI	BI	M
COOP 767-53	AI	MI	BI	M
COOP 767-63	AI	MI	MI	M
COOP 767-68	MI	AI	MI	M
COOP 767-89	AI	BI	BI	M
COOP 886-41	BI	MI	BI	B
COOP 886-42	MI	MI	BI	M
COOP 886-54	AI	AI	BI	M
COOP 886-55	AI	BI	BI	M
COOP 886-81	AI	MI	BI	M

4.1.2 PROGRAMA DE “RETROCREUAMENTS”

Les 11 plantes seleccionades de COOP 767 i les 5 de COOP 886 es van utilitzar com a mares en el C1 amb “Euphrates” (Abril-Juny 2014). D'aquestes 16 seleccions es va obtenir llavor del C1. D'altra banda, d'aquests creuaments es van obtenir diferent nombre de plantes total i nombre de plantes heterozigòtiques (Taula 5).

Taula 5 . Informació de les plantes procedents del creuament inicial (C1) de les plantes de les seleccions per l'híbrid Euphrates

Selecció	Nº Plantes	Nº Plantes heterocigòtiques
COOP 767-22	19	3
COOP 767-27	37	13
COOP 767-38	30	11
COOP 767-44	24	9
COOP 767-50	20	7
COOP 767-53	33	11
COOP 767-54	24	4
COOP 767-57	28	8
COOP 767-63	34	10
COOP 767-68	26	8
COOP 767-89	47	18
COOP 886-41	24	8
COOP 886-42	19	11
COOP 886-54	20	6
COOP 886-55	19	8
COOP 886-81	22	10

El cicle següent (Abril-Juny 2015) es va realitzar el RC1 emprant aquelles plantes heterozigòtiques procedents del C1 com a parental masculí i les plantes procedents del la autofecundació de les 16 seleccions inicials com a parental femení. D'aquests creuaments es van obtenir diferent nombre de plantes total i nombre de plantes heterozigòtiques (Taula 6). Dels 16 llinatges inicials no es va aconseguir realitzar amb èxit el RC1 amb els llinatges COOP 767-44, COOP 767-54 i COOP 767-57. Cal destacar que per al llinatge COOP 767-27, el RC1 tot i que es va poder realitzar amb èxit, no es van poder obtenir plantes d'aquest retrocreuament ja que les llavors no van germinar. D'aquesta manera el programa de retrocreuaments va seguir amb els 12 llinatges restants. Aquest procés es va repetir realitzant així el RC2 (Setembre-Desembre 2015), i d'aquesta manera, es va obtenir diferent nombre de plantes total i nombre de plantes heterozigòtiques (Taula 7).

Taula 6. Informació de les plantes procedents del Primer Retrocreuament (RC1).

Selecció	Nº Plantes	Nº Plantes heterocigòtiques
COOP 767-22Fr.1	39	4
COOP 767-22Fr.2	13	4
COOP 767-27	0	0
COOP 767-38	10	4
COOP 767-50	20	4
COOP 767-53	37	4
COOP 767-63	41	4
COOP 767-68	12	3
COOP 767-89	9	2
COOP 886-41Fr.1	24	6
COOP 886-41Fr.2	29	3
COOP 886-42	37	4
COOP 886-54	44	8
COOP 886-55Fr.1	17	7
COOP 886-55Fr.2	27	4
COOP 886-81	9	1

Taula 7 .Informació de les plantes procedents del RC2

Selecció	Nº Plantes	Nº Plantes heterocigòtiques
COOP 767-22	43	7
COOP 767-38	41	10
COOP 767-50	43	10
COOP 767-53	37	6
COOP 767-63	47	20
COOP 767-68	19	7
COOP 767-89	16	3
COOP 886-41	18	7
COOP 886-42	40	5
COOP 886-54	42	8
COOP 886-55	52	10
COOP 886-81	24	3

Actualment (Abril- Juny 2016) s'estan duent a terme els creuaments corresponents al RC3 amb els 12 llinatges; COOP-767 22, 38, 50, 53, 63, 68 i 89 i COOP-886 41, 42, 54, 55 i 81 , per la qual cosa només es disposa de la informació corresponent al nombre de creuaments realitzats així com al nombre de fruits quallats.

Cal destacar que a mesura que avançava el programa de millora i es duïen a terme els creuaments, també es va fer una selecció d'aquells individus heterozigots procedents del RC1 i RC2, que sent heterozigots, eren fenotípicament més semblants a la "Tomaca Valenciana d'El Perelló". Per a dur a terme aquesta selecció es van seguir els següents criteris: "Aparença Valenciana" (0=Euphrates, 10= Valenciana), "Espatlla" (Baixa intensitat/Alta intensitat), "Forma apuntada del fruit" (Baixa intensitat/Alta intensitat), "Acostellat del fruit" (Baixa intensitat/Alta intensitat), "Quallat" (Baix/Alt). Tota la informació corresponent a la caracterització d'aquestes plantes es troba recollida a l'ANNEXE I. A la Taula 8 es mostra un exemple d'aquesta caracterització.

Taula 8. Caracterització dels individus heterozigots procedents del RC1 llinatge COOP 886-54. L'aparença valenciana(0=Euphrates, 10= Valenciana), Espatlla (BI=Baixa intensitat, MI= Mitjana intensitat, AI= Alta intensitat), Forma apuntada (BI=Baixa intensitat, MI= Mitjana intensitat, AI= Alta intensitat), Acostellat (BI=Baixa intensitat, MI= Mitjana intensitat, AI= Alta intensitat) i Quallat (A=Alta, M= Mitjà, B=Baix).

Individu	Aparença valenciana	Espatlla	Forma apuntada	Acostellat	Quallat
1	6	MI	MI	BI	A
2	8	MI	MI	MI	A
3	8	AI	BI	MI	A
4	6	AI	BI	BI	A
5	2	BI	BI	BI	A
6	2	BI	BI	BI	A
7	6	MI	BI	BI	A
8	2	AI	BI	BI	B

Hi ha diferents aspectes que han de ser tractats. El primer és el nombre desigual de plantes totals obtingudes de cada llinatge. Això principalment està relacionat amb el nombre de fruits quallats en cada cicle, així com amb la viabilitat de les llavors obtingudes, la germinabilitat d'aquestes i al fet que en cada cicle, les plantes que mostraven símptomes d'algun tipus de virosi eren arrancades immediatament per tal de reduir al màxim la dispersió del virus per tot arreu de l'hivernacle.

D'altra banda, un altre aspecte que paga la pena discutir és el nombre desigual de plantes heterozigòtiques de cada llinatge així com la proporció inesperada de plantes heterozigòtiques. En tots els creuaments realitzats (C1, RC1, RC2 i RC3) s'esperava que el 50% de la descendència fóra heterozigòtica ja que el que s'estava creuant en cada cas eren individus heterozigòtics ($Tm2^2tm2^2$) amb homozigòtics recessius ($tm2^2tm2^2$) i sols s'estava prestant atenció a un únic locus. El fet que en la majoria de casos el nombre de plantes heterozigòtiques fóra menor al 50% es pot justificar atenent a la manera d'agafar mostres així com a l'hora d'interpretar els resultats del genotipat. Dit d'una altra manera, el camp on estaven les plantes a ser genotipades es trobava a una localitat diferent d'on es trobava el laboratori on es processaven, cosa que feia inviable la utilització de Nitrogen líquid per a ultracongelar les mostres i així poder evitar la degradació d'ADN i d'altres components del teixit vegetal. És per això que d'algunes plantes era complicat extraure ADN d'alta qualitat. El problema, si cap, era l'alta sensibilitat que l'anàlisi HRM tenia a les mostres d'ADN de baixa qualitat, cosa que podia produir distorsions en la interpretació de resultats. És per això que només es seleccionaven com a individus heterozigòtics aquells que no presentaven cap dubte d'interpretació. Cal destacar que aquelles mostres que eixien distorsionades a causa de la baixa qualitat de l'ADN eren eliminades i per tant no seleccionades com a font de pol·len per a fer el següent retrocreuament. Es a dir, es volia evitar de qualsevol manera elegir un individu com a portador de l'al·lel de resistència quan no ho era.

Per últim, l'altre aspecte que cal tractar és la successió temporal dels cicles de cultiu realitzats. Atenent al fet que en el cultiu de la tomaca, i més a València que disposa d'hiverns suaus, es poden realitzar dos cicles de cultiu a l'any, la successió lògica de cicles en aquest programa de millora hauria d'haver sigut: 1^oCicle C1 (Abril-Juny 2014), 2^o Cicle RC1 (Setembre-Desembre 2014), 3^o Cicle RC2 (Abril-Juny 2015), 4^o Cicle RC3 (Setembre-Desembre 2015) i 5^o Cicle RC4 (Abril-Juny 2016). En canvi la successió real va ser: 1^oCicle C1 (Abril-Juny 2014), 2^o Cicle RC1 (Abril-Juny 2015), 3^o Cicle RC2 (Setembre-Desembre 2015) i 4^o Cicle RC3 (Abril-Juny 2016). El motiu pel qual la successió de cicles va ser la segona i no la primera és que durant la realització del cicle de Setembre-Desembre de 2014 la selecció d'individus heterozigòtics es va dur a terme a nivell de plàntula abans de trasplantar a camp, cosa que va endarrerir el trasplant. Açò va fer que es retrassara la realització de creuaments a novembre-desembre i es va comprometre el quallat de fruits amb llavors, obtenint-se així fruits sense llavors o amb llavors inviables. D'aquesta manera, el cicle següent (Abril-Juny 2015) es va haver de repetir el procés per a aconseguir obtenir llavor de RC1. Cal destacar que a partir d'aquest cicle, i per a evitar el retràs en els cicles de tardor i no perdre cap cicle, el genotipat es va dur a terme una vegada transplantades les plantes.

4.2 GENOTIPAT D'HETEROZIGOTS: ANÀLISI DE L'SNP ASSOCIAT A L'AL·LEL DE RESISTÈNCIA

Mitjançant l'anàlisi d'SNPs a través de HRM es van poder identificar els individus heterozigots ($Tm2^2tm2^2$) portadors de l'al·lel de resistència. (Wittwer et al., 2003; Mackay i Wright, 2008). Una vegada fets els anàlisis amb HRM es van assignar els al·lels corresponents a cada individu comparant les corbes generades per cada individu amb les corbes generades pels controls heterozigots ($Tm2^2tm2^2$) i homozigots recessius ($tm2^2tm2^2$) que es tractaven de "Euphrates" i un individu de la població valenciana inicial "COOP 767-38" respectivament (Figura 18).

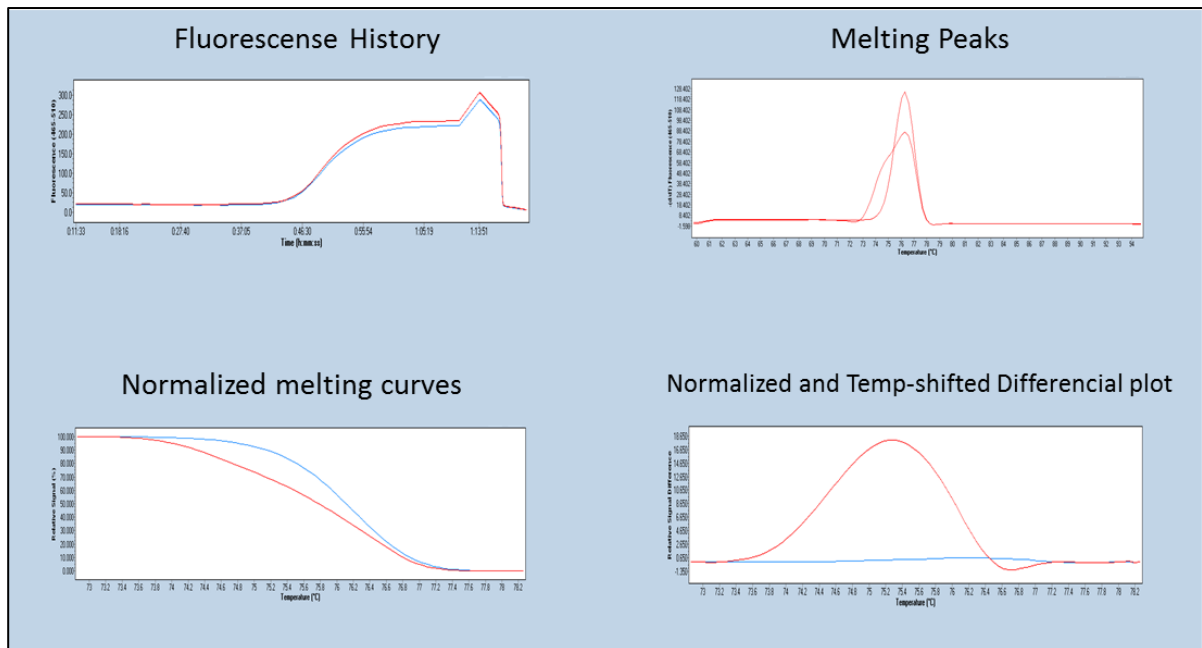


Figura 18. Anàlisi de corbes d'HRM. La imatge de dalt a l'esquerra fa referència a l'amplificació a temps real. La imatge de dal a la dreta fa referència a les corbes de fusió. La imatge de baix a l'esquerra fa referència a les corbes de fusió normalitzades. Per últim, la imatge de baix a l'esquerra fa referència al "Differential Plot", que és un gràfic normalitzat a partir de la senyal relativa diferenciada.

4.3 VALIDACIÓ DE LA RESISTÈNCIA A *ToMV* MITJANÇANT LA INOCULACIÓ MECÀNICA DEL VIRUS

Per a dur a terme la validació de la resistència a *ToMV* d'aquelles plantes portadores de l'al·lel de resistència " $Tm2^2$ " es van obtenir esqueixos de 18 plantes heterozigòtiques aleatòries i de 2 plantes homozigòtiques recessives. Després de preparar l'inòcul i dur a terme la inoculació es va dur a terme l'anàlisi serològic de les mostres. Aquesta validació es va repetir en cada cicle de cultiu per tal de comprovar l'eficàcia en la selecció i la resistència atorgada pel gen $Tm2^2$. Els resultats indiquen que, en efecte, l'al·lel de resistència està present i que atorga resistència efectiva front al *ToMV*. Per un altre costat, cal destacar, que en el 3^o

cicle de cultiu (Setembre-Desembre 2015) va haver un brot de *ToMV* a l'hivernacle on s'estava duent a terme el programa de millora (obtenció del RC2). El tret important d'açò va ser que totes les plantes que genotípicament havien estat identificades com a portadores de l'al·lel de resistència en el RC1, mostraven un vigor adequat i no mostraven símptomes de virosi (Figura 19). En canvi, la resta de plantes, o siga, les homozigòtiques recessives de forma molt evident mostraven la típica simptomatologia provocada pel virus del *ToMV* (Figura 19).



Figura 19. Planta heterozigòtica i planta homozigòtica recessiva en el cicle on va haver el brot de *ToMV*. El requadre taronja conté una planta heterozigòtica que no mostra cap tipus de símptoma de virosi i mostra vigor normal. El requadre groc conté una planta homozigòtica recessiva que mostra els típics símptomes.

5. CONCLUSIONS

1. S'han seleccionat tomaques valencianes per a diferents característiques morfològiques i agronòmiques com ara "Aparença Valenciana", "Espatlla", "Forma apuntada del fruit", "Acostellat del fruit" i "Quallat". Així doncs es disposa de 13 llinatges de tomaca "valenciana" amb diferents característiques.
2. S'ha dut a terme un programa de retrocreuaments on es disposa de material procedent del RC2, per a 12 llinatges, amb fenotips avançats de valenciana així com amb resistència efectiva a *ToMV*.
3. El marcador molecular associat a l'al·lel de resistència "*Tm2²*" ha mostrat ser eficaç per a seleccionar aquells individus portadors de dit al·lel. Aquesta eficàcia de selecció s'ha comprovat amb inoculacions mecàniques en cada cicle de cultiu així com en condicions d'infecció en camp.
4. L'al·lel de resistència "*Tm2²*" ha mostrat ser efectiu front al virus *ToMV* cosa que ens permetrà obtenir una varietat fenotípicament valenciana i amb resistència a aquest virus.
5. La consecució d'aquest programa de millora, una vegada s'obtinguen el RC3 i l' RC4 i les posteriors autofecundacions amb les quals quedarà fixat el gen de resistència, permetrà posar a disposició del llaurador una varietat de "Tomaca Valenciana d' El Perelló", resistent al *ToMV* i amb bones característiques agronòmiques i morfològiques.

6. BIBLIOGRAFIA

- Amador, L., Santos, B., Ríos, D. (2012). Variedades tradicionales de tomates de Canarias. *Tenerife. ISBN*. Obtingut en:
<http://sechaging-madrid2013.org/geystiona/adjs/comunicaciones/272/C06450001.pdf>
- Blanca, J., Cañizares, J., Cordero, L., Pascual, L., Díez, M. (2012). Variation revealed by SNP genotyping and morphology provides insight into the origin of the tomato. *PLoS One*. Obtingut en:
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0048198>
- Carravedo, M. (2006). Variedades autóctonas de tomates de Aragón. *De Tecnología Agroalimentaria de Aragón*. Retrived from:
<http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=INIA.xismethod=postformato=2cantidad=1expresion=mfn=018629>
- Casals, J. (2012). *Filogènia i variabilitat genètica de les varietats tradicionals de tomàquet (Solanum lycopersicum L.) Montserrat/Pera de Girona i Penjar. Estratègies per a la millora de la seva qualitat organolèptica*. Universitat Politècnica de Catalunya.
- Casals, J., Bosch, L., Casañas, F., Cebolla, J. (2010). Montgrí, a cultivar within the Montserrat tomato type. Obtingut en:
<http://hortsci.ashspublications.org/content/45/12/1885.short>
- Cebolla-Cornejo, J. (2005). *Recuperación de variedades tradicionales de tomate y pimiento. Caracterización y mejora genética*. Fernando Nuez. Universitat Politècnica de València.
- Cebolla-Cornejo, J., Roselló, S., Nuez, F. (2013). Phenotypic and genetic diversity of Spanish tomato landraces. *Scientia Horticulturae*. Obtingut en:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030442381300407X>
- Cerdan, J. (2015). *Caracterización morfológica y agronómica de una colección de variedades tradicionales de tomate de Valencia*. Salvador Soler. Universitat Politècnica de València. Disponible en : riunet.upv.es
- Clark, M., Adams, A. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*. Obtingut en:
<http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-34-3-475>
- Cortés-Olmos, C, Valcárcer JV, Roselló J, Díez MJ, Cebolla-Cornejo J. 2015. Tradicional Eastern Spanish varieties of tomato. *Scientia Agricola*, 5:420-431
- Cuartero, J. (2001). Tomate para consumo en fresco. *Sociedad Española de Ciencias Hortícolas*.
- Ding, X., Shintaku, M., Arnold, S. (1995). Accumulation of mild and severe strains of tobacco mosaic virus in minor veins of tobacco. *MPMI-Molecular Plant*. Obtingut en:
<http://www.apsnet.org/publications/mpmi/BackIssues/Documents/1995Articles/Microbe08-32.pdf>

- Doré, C., Varoquaux, F. (2006). Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées. Obtingut en: <https://books.google.es/books?hl=eslr=id=6pbtFya2zy8Coi=fndpg=PA17dq=histoire+et+a+melioration+des+cinquante+plantes+cultiveesots=qvTWbf1eMEsig=VtBLBIJMVkZwNloPhjU3pnafzYo>
- Dominguez, A. 1998. Conservación, caracterización y redistribución de variedades hortícolas tradicionales. Experiencias con agricultores ecológicos en Valencia.
- Doyle, J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull.* Obtingut en: <http://ci.nii.ac.jp/naid/10021087108/>
- Esquinas-Alcázar, J. y Nuez, F. (1995). *Situación taxónomica, domesticación y difusión del tomate*. Mundi-Prensa.
- El Mundo (2013). *Los secretos del mejor tomate*. Visto el 20 de Mayo de 2015 en: <http://www.elmundo.es/elmundo/2013/07/06/valencia/1373137440.html>
- Fantova, M., Gómez, J. de G. (2005). Variedades autóctonas de tomate del País Vasco. Obtingut en: <http://germoplasma.net/wp-content/uploads/2013/04/Variedades-de-tomate-1.pdf>
- FAO. (1996). The state of world's plant genetic resource for food and agriculture.
- FAO. (2011). *El estado de los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura en el mundo*. Segundo informe.
- FAO. (2014). Buscador de datos estadísticos de la FAO.
- Figàs, M. R., Prohens, J., Raigón, M. D., Fernández-de-Córdova, P., Fita, A., Soler, S. (2015a). Characterization of a collection of local varieties of tomato (*Solanum lycopersicum L.*) using conventional descriptors and the high-throughput phenomics tool Tomato analyzer. *Genetic Resource and Crop Evolution*, 62(2), 189-204. Obtingut en: <http://doi.org/10.1007/s10722-014-0142-1>
- Figàs, M. R., Prohens, J., Raigón, M. D., Fita, A., García-Martínez, M. D., Casanova, C., Soler, S. (2015b). Characterization of composition traits related to organoleptic and functional quality for the differentiation, selection and enhancement of local varieties of tomato from different cultivar groups. *Food Chemistry*, 187, 517-524. Obtingut en: <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.083>
- García-Martínez, S., Grau, A., Alonso, A. (2015). *UMH 916, UMH 972, UMH 1093, UMH 1127, and UMH 1139: Four Fresh-market Breeding Lines Resistant to Viruses Within the Muchamiel Tomato Type*. Obtingut en: <https://hortsci.ashspublications.org/content/50/6/927.full>
- Hall, T. (1980). Resistance at the Tm-2 locus in the tomato to tomato mosaic virus. *Euphytica*. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1007/BF00037266>
- Harlan, J. R., Jack R. (1975). *Crops amp; man*. American Society of Agronomy.
- Junta consultiva agrícola. (1914). *Avance estadístico de la riqueza en España representa la producción media anual de las plantas hortícolas y plantas industriales*. Ministerio de Fomento.

- López, F. R. (2015). Efecto de la introducción de genes de resistencia a virosis en tomate sobre caracteres agronómicos y de calidad organoléptica de variedades localmente. Retrieved from :<http://dspace.umh.es/handle/11000/2070>
- Mackay, J., Wright, C. (2008). A new approach to varietal identification in plants by microsatellite high resolution melting analysis: application to the verification of grapevine and olive. *Plant. Obtingut en:* <http://plantmethods.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-4811-4-8>
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. 2016. Estadísticas agricultura. Superficie y producción anuales de cultivo. Disponible en: www.magrama.org.es
- Nuez, F., Rodríguez del Rincón, A. (1995). *El cultivo del tomate*. Mundi-Prensa.
- Paran, I., Knaap, E. van der. (2007). Genetic and molecular regulation of fruit and plant domestication traits in tomato and pepper. *Journal of Experimental Botany*. Retrieved from <http://jxb.oxfordjournals.org/content/58/14/3841.short>
- Pascual, J. A., Lavilla, P. B. (2014). Evaluación de material vegetal seleccionado de tomate rosa de Barbastro (*Solanum lycopersicum* L.). Obtingut en: <http://citarea.cita-aragon.es/citarea/handle/10532/2703>
- Shi, A., Vierling, R., Grazzini, R., Chen, P. (2011). Molecular markers for Tm-2 alleles of tomato mosaic virus resistance in tomato. *American Journal of plant science*. Retrieved from <http://file.scirp.org/Html/5712.html>
- Soler, S., Prohens, J., López, C., Aramburu, J. (2010). Viruses infecting tomato in Valencia, Spain: Occurrence, distribution and effect of seed origin. *Journal of phytopathology*. Obtingut en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0434.2010.01706.x/full>
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., Rozen, S. G. (2012). Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15), e115. Obtingut en: <http://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- Wittwer, C., Reed, G., Gundry, C. (2003). High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clinical chemistry*. Retrieved from Obtingut en: <http://www.clinchem.org/content/49/6/853.short>

ANNEXE I

Caracterització dels individus heterozigots procedents del RC1. L'aparença valenciana (0=Euphrates, 10= Valenciana), Espatlla (BI=Baixa intensitat, MI= Mitjana intensitat, AI= Alta intensitat), Forma apuntada (BI=Baixa intensitat, MI= Mitjana intensitat, AI= Alta intensitat), Acostellat (BI=Baixa intensitat, MI= Mitjana intensitat, AI= Alta intensitat) i Quallat (A=Alta, B=Baix).

Llinatge COOP 886-41:

Individu	Aparença valenciana	Espatlla	Forma apuntada	Acostellat	Quallat
1	2	BI	BI	MI	B
2	2	BI	BI	BI	B
3	4	MI	BI	MI	B
4	6	AI	BI	MI	B
5	7	AI	BI	MI	B

Llinatge COOP 886-42:

Individu	Aparença valenciana	Espatlla	Forma apuntada	Acostellat	Quallat
1	2	BI	BI	BI	B
2	8	AI	MI	AI	B
3	8	AI	MI	BI	A

Llinatge COOP 886-54:

Individu	Aparença valenciana	Espatlla	Forma apuntada	Acostellat	Quallat
1	6	MI	MI	BI	A
2	8	MI	MI	MI	A
3	8	AI	BI	MI	A
4	6	AI	BI	BI	A
5	2	BI	BI	BI	A
6	2	BI	BI	BI	A
7	6	MI	BI	BI	A
8	2	AI	BI	BI	B

Llinatge COOP 886-55 Fr1:

Individu	Aparença valenciana	Espatlla	Forma apuntada	Acostellat	Quallat
1	9	AI	AI	BI	A
2	8	AI	AI	MI	A
3	4	MI	BI	MI	A
4	4	MI	BI	MI	A
5	5	MI	BI	BI	A
6	9	AI	BI	AI	A
7	4	AI	BI	MI	A

Llinatge COOP 886-55 Fr2:

Individu	Aparença valenciana	Espatlla	Forma apuntada	Acostellat	Quallat
1	4	MI	BI	MI	A
2	9	AI	MI	MI	A
3	4	MI	BI	MI	M
4	4	MI	BI	MI	B

Llinatge COOP 886-81:

Individu	Aparença valenciana	Espatlla	Forma apuntada	Acostellat	Quallat
1	6	AI	BI	MI	A

Llinatge COOP 767-89:

Individu	Aparença valenciana	Espatlla	Forma apuntada	Acostellat	Quallat
1	9	AI	MI	MI	A
2	4	MI	BI	MI	B
3	7	AI	BI	MI	M
4	6	AI	BI	MI	A
5	4	AI	BI	AI	B
6	6	MI	BI	MI	B
7	8	AI	MI	MI	A

Llinatge COOP 767-38:

Individu	Aparença valenciana	Espatlla	Forma apuntada	Acostellat	Quallat
1	9	BI	BI	MI	A
2	4	BI	BI	MI	M
3	6	MI	BI	MI	A
4	4	MI	AI	MI	M

Llinatge COOP 767-22 Fr1:

Individu	Aparença valenciana	Espatlla	Forma apuntada	Acostellat	Quallat
1	6	MI	BI	MI	B
2	6	AI	BI	MI	B
3	4	MI	BI	MI	B

Llinatge COOP 767-22 Fr2:

Individu	Aparença valenciana	Espatlla	Forma apuntada	Acostellat	Quallat
1	6	MI	BI	AI	M
2	6	MI	BI	AI	M
3	6	AI	BI	AI	B
4	2	MI	BI	MI	B

Llinatge COOP 767-50:

Individu	Aparença valenciana	Espatlla	Forma apuntada	Acostellat	Quallat
1	3	MI	BI	MI	B
2	4	BI	BI	MI	B
3	4	MI	MI	MI	M
4	8	AI	MI	MI	A
5	6	MI	MI	MI	A
6	2	MI	BI	BI	A
7	7	MI	MI	MI	M
8	2	MI	BI	BI	M
9	9	AI	AI	MI	M
10	6	MI	AI	AI	A
11	4	BI	BI	MI	M
12	5	MI	BI	BI	M
13	2	MI	BI	BI	B
14	6	AI	BI	MI	A
15	7	AI	BI	MI	A
16	7	AI	BI	MI	A
17	6	MI	BI	MI	B
18	6	AI	MI	AI	M
19	4	MI	BI	MI	M

Llinatge COOP 767-53:

Individu	Aparença valenciana	Espatlla	Forma apuntada	Acostellat	Quallat
1	2	AI	BI	MI	A
2	2	AI	BI	MI	A
3	7	AI	AI	MI	A

Llinatge COOP 767-68 Fr1:

Individu	Aparença valenciana	Espatlla	Forma apuntada	Acostellat	Quallat
1	4	BI	BI	MI	B
2	6	AI	MI	MI	A
3	6	AI	BI	MI	A

Llinatge COOP 767-68 Fr2:

Individu	Aparença valenciana	Espatlla	Forma apuntada	Acostellat	Quallat
1	2	AI	BI	MI	M
2	7	AI	BI	MI	M

Llinatge COOP 767-63:

Individu	Aparença valenciana	Espatlla	Forma apuntada	Acostellat	Quallat
1	2	MI	BI	MI	B
2	6	AI	BI	MI	M
3	8	AI	BI	MI	A

Caracterització dels individus heterozigots procedents del RC2. L'aparença valenciana (0=Euphrates, 10= Valenciana), Espatlla (BI=Baixa intensitat, MI= Mitjana intensitat, AI= Alta intensitat), Forma apuntada (BI=Baixa intensitat, MI= Mitjana intensitat, AI= Alta intensitat), Acostellat (BI=Baixa intensitat, MI= Mitjana intensitat, AI= Alta intensitat) i Quallat (A=Alta, B=Baix).

Llinatge COOP 886- 41:

Individu	Aparença valenciana	Espatlla	Forma apuntada	Acostellat	Quallat
1	7	AI	AI	BI	A
2	6	AI	MI	MI	B
3	6	AI	MI	MI	A
4	7	AI	MI	MI	A
5	8	AI	AI	BI	M
6	8	AI	AI	BI	M
7	7	AI	MI	MI	M
8	9	AI	AI	BI	A

Llinatge COOP 886-42:

Individu	Aparença valenciana	Espatlla	Forma apuntada	Acostellat	Quallat
1	8	AI	MI	MI	M
2	8	AI	BI	BI	A
3	7	AI	MI	MI	M
4	7	AI	BI	BI	M
5	7	AI	BI	BI	B

Llinatge COOP 886-54:

Individu	Aparença valenciana	Espatlla	Forma apuntada	Acostellat	Quallat
1	7	AI	BI	MI	A
2	7	AI	MI	BI	M
3	6	AI	BI	MI	M
4	7	AI	BI	BI	A
5	7	AI	AI	AI	A
6	7	AI	AI	AI	A
7	7	AI	MI	BI	A

Llinatge COOP 886-55:

Individu	Aparença valenciana	Espatlla	Forma apuntada	Acostellat	Quallat
1	7	AI	BI	BI	A
2	7	BI	MI	MI	B
3	8	AI	MI	MI	M
4	6	AI	BI	MI	M
5	6	AI	BI	AI	M
6	8	AI	MI	MI	M
7	7	AI	MI	MI	M
8	7	AI	BI	AI	M
9	9	AI	MI	BI	M
10	7	AI	MI	MI	A

Llinatge COOP 886-81

Individu	Aparença valenciana	Espatlla	Forma apuntada	Acostellat	Quallat
1	7	AI	BI	MI	M
2	0	MI	MI	BI	A
3	6	AI	BI	AI	A

Llinatge COOP 767-89:

Individu	Aparença valenciana	Espatlla	Forma apuntada	Acostellat	Quallat
1	6	AI	BI	AI	A
2	6	AI	BI	AI	M
3	8	AI	BI	MI	M

Llinatge COOP 767-22:

Individu	Aparença valenciana	Espatlla	Forma apuntada	Acostellat	Quallat
1	5	AI	BI	BI	M
2	7	AI	MI	MI	M
3	8	AI	MI	MI	M
4	6	AI	BI	MI	M
5	8	AI	MI	MI	M
6	6	MI	BI	BI	M
7	8	AI	MI	MI	A

Llinatge COOP 767-38:

Individu	Aparença valenciana	Espatlla	Forma apuntada	Acostellat	Quallat
1	9	AI	AI	MI	A
2	6	AI	BI	BI	M
3	8	AI	MI	MI	B
4	8	AI	MI	MI	M
5	9	AI	AI	BI	A
6	7	AI	BI	AI	M
7	8	AI	MI	MI	M
8	9	AI	AI	BI	A
9	8	AI	MI	BI	M
10	8	AI	MI	BI	A

Llinatge COOP 767-50:

Individu	Aparença valenciana	Espatlla	Forma apuntada	Acostellat	Quallat
1	8	AI	MI	MI	A
2	8	AI	AI	BI	A
3	7	AI	BI	MI	A
4	7	AI	MI	BI	A
5	6	AI	BI	MI	A
6	6	AI	BI	MI	A
7	6	MI	BI	BI	A
8	5	AI	BI	BI	A
9	6	AI	MI	BI	A
10	7	AI	BI	MI	A

Llinatge COOP 767-53:

Individu	Aparença valenciana	Espatlla	Forma apuntada	Acostellat	Quallat
1	6	AI	BI	BI	A
2	7	AI	BI	MI	M
3	8	AI	AI	MI	M
4	8	AI	MI	MI	A
5	8	AI	AI	MI	A
6	8	AI	MI	AI	A

Llinatge COOP 767-63:

Individu	Aparença valenciana	Espatlla	Forma apuntada	Acostellat	Quallat
1	7	AI	MI	MI	A
2	8	AI	MI	MI	A
3	8	AI	MI	MI	A
4	8	AI	BI	AI	A
5	7	AI	BI	MI	M
6	7	AI	BI	AI	A
7	8	AI	MI	MI	A
8	6	AI	BI	MI	B
9	7	AI	MI	MI	M
10	7	AI	BI	BI	A
11	7	AI	BI	AI	M
12	6	AI	BI	MI	M
13	7	AI	BI	AI	A
14	6	AI	BI	MI	A
15	7	AI	BI	BI	M
16	7	AI	BI	MI	M
17	8	AI	MI	AI	M
18	8	AI	BI	AI	A
19	7	AI	BI	MI	A
20	8	AI	BI	MI	A