



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**SELECCIÓN DE NUEVOS CULTIVARES DE TOMATE
RESISTENTES A PATÓGENOS (TYLCV, TSWV Y *Fusarium
oxysporum* f. sp. *lycopersici*) ASISTIDO DE MARCADORES
MOLECULARES Y ENSAYOS FENOTÍPICOS**

Por:

Richecarde Lafrance

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE PRODUCTOS AGRÍCOLAS PARA
ZONAS TROPICALES Y SUBTROPICALES

Como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Richecarde Lafrance, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias.



Dra. Josefina León Félix
Directora de tesis



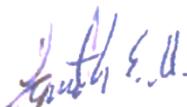
Dra. María Claudia Villicaña Torres
Integrante de comité de tesis



Dr. José Benigno Valdez Torres
Integrante de comité de tesis



Dr. Raymundo Saúl García Estrada
Integrante de comité de tesis



Dra. Mayra Janeth Esparza Araiza
Integrante de comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Selección de Nuevos Cultivares de Tomate Resistentes a Patógenos (TYLCV, TSWV y *Fusarium Oxysporum* f. sp. *lycopersici*) Asistido de Marcadores Moleculares y Ensayos Fenotípicos" es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Richecarde Lafrance, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar *los* créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Graciela Caire Juvera", is written over a horizontal line.

Dra. Graciela Caire Juvera
Directora General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por la beca otorgada para mis estudios de doctorado (CVU 935564)

Al Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo A. C. (CIAD) especialmente al departamento de Biología Molecular y Genómica Funcional (BIMOGEN) por el apoyo brindado durante mis estudios de doctorado y por permitirme ser parte de esta gran institución.

A la Universidad de Lincoln-Nebraska especialmente al departamento de fitopatología (el laboratorio de virología de Dr. Hernán García Ruiz) por el apoyo brindado durante mis estancias de investigación.

A la empresa TRICAR por su apoyo económico y de personal a este proyecto.

DEDICATORIA

A Dios por inculcarme el anhelo de superación, paciencia, sabiduría y energía suficiente para culminar con éxito mis metas establecidas.

A mi mamá Christna Michel y mi papá Jovert Lafrance que aun estando a miles de kilómetros siempre estaban presente mediante video llamadas y audios para apoyarme mentalmente. Gracias, mamá por estos audios tan reconfortantes que me dejabas cada mañana antes de que yo me levantaba, es bueno saber que hay alguien que se preocupa por mí todos los días. Estos audios me recordaban por qué me tenía que levantar temprano y seguir estudiando.

A mi directora de tesis la Dra. Josefina León Félix y por aceptarme como su estudiante, por su confianza, y sus apoyos incondicionales.

A mis asesores la Dra. María Claudia Villicaña Torres, Dra. Mayra Janeth Esparza Araiza, el Dr. Raymundo Saúl García, el Dr. José Benigno Valdez Torres.

Al Técnico del laboratorio de BIMOGEN el Q.F.B Carillo Yáñez Jesús Héctor.

A Luis A. Osuna García e Isidro Márquez Zequera Técnicos del laboratorio de Fitopatología Molecular.

A mis profesores

A los estudiantes de licenciatura Sergio y Jessie que apoyaron en los experimentos.

A mis amigos y compañeros de doctorado y ahora amigos de la vida Brandon Estefano, Lucia Margarita, Christian, Imen, Jessy, Amany Erick.

A mis amigos y compatriotas haitianos Ing. Jelf Romario Celestin, Ing. Pierre-John Bernard, Mtro Jean Rocheford Louis, Ing. Saintus Zephir, Ing. Kermann Oneeyo Laguerre.

A mi equipo de negocios, los miembros de la empresa UPLOAD M.C. Saintus Zephir, ADM. Adler Filder, Dr. Cliff Labady, ADM John Obed Thebaud. Scott Munger Lorémond

A mis hermanos y hermanas Cartin Jupiter, Eddy Lafrance, Jovline Lafrance, Joventha Lafrance y Laurie Sofiaïca Asley Lafrance.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
CONTENIDO	6
LISTA DE CUADROS	8
RESUMEN	9
ABSTRACT	11
1. SINOPSIS	12
1.1. Justificación	12
1.2. Antecedentes.....	13
1.2.1. Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.).....	13
1.2.2. Interacción Hospedero-Patógeno	14
1.2.3. Mecanismo de Resistencia.....	15
1.2.3.1 Tipos de resistencia	15
1.2.4. Síntomas de los Patógenos en las Plantas	18
1.2.4.1. Síntomas de TSWV.....	18
1.2.4.2. Síntomas de TYLCV.....	18
1.2.4.3. Síntomas de <i>Fol.</i>	19
1.2.5. Genes de Resistencia	20
1.2.5.1. Genes de resistencia a <i>Fol.</i>	21
1.2.5.2. Genes de resistencia a TYLCV.....	22
1.2.5.3. Genes de resistencia a TSWV.....	23
1.2.6. Los marcadores moleculares.....	24
1.2.6.1. Clasificación de los marcadores moleculares.	24
1.2.6.2. Tipos de marcadores moleculares.....	25
1.2.6.3. Marcadores moleculares ligados a genes de resistencia al TYLCV.....	26
1.2.6.4. Marcadores moleculares ligados a genes de resistencia al <i>Fol.</i>	26
1.2.6.5. Marcadores moleculares vinculados a genes de resistencia a TSWV.....	27
1.2.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa	27
1.2.8. Optimización.....	28
1.2.8.1. Metodología de superficie respuesta (RSM).....	29
1.2.8.2. Optimización de PCR.....	29
1.2.9. Validación.....	30
1.2.9.1. Especificidad.....	30
1.2.9.2. Límite de detección.....	30
1.2.9.3. Selectividad.....	30
1.2.9.4. Rango dinámico.	31
1.2.9.5. Repetibilidad.....	31

CONTENIDO (continuación)

1.2.9.6. Reproducibilidad.....	31
1.2.10. Calidad de los Frutos del Tomate	31
1.2.10.1. Producción y maduración del tomate.....	31
1.2.10.2. Parámetros de calidad.	32
1.2.10.3. Validación fenotípica.	33
1.3. Hipótesis	33
1.4. Objetivo General.....	34
1.5. Objetivos Específicos	34
1.6. Sección Integradora del Trabajo.....	35
2. RESPONSE SURFACE METHODOLOGY FOR OPTIMIZATION OF MULTIPLEX-PCR PROTOCOLS FOR DETECTION OF TYLCV, TSWV AND <i>Fol</i> MOLECULAR MARKERS: ANALYTICAL PERFORMANCE EVALUATION.....	36
3. SELECTION OF TOMATO (<i>Solanum lycopersicum</i>) HYBRIDS RESISTANT TO FOL, TYLCV, TSWV, WITH EARLY MATURITY AND GOOD FRUIT QUALITY DEVELOPED IN SINALOA.....	48
4. BEHAVIOR OF TOMATO PLANTS DEVELOPED IN SINALOA INOCULATED WITH <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>.....	60
5. REFERENCIAS	73
6. CONCLUSIONES GENERALES	78

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Marcadores de resistencia a TYLCV, tipos y genes asociados.....	26
2. Marcadores de resistencia a Fol tipos y genes asociados.....	27
3. Marcadores de ADN resistentes a TSWV y genes asociados.....	27

RESUMEN

En México, el tomate es una de las principales hortalizas de exportación, cultivada en la mayoría de los estados del noroeste del país, siendo el estado de Sinaloa uno de los mayores productores. Sin embargo, su producción está sujeta a fuertes pérdidas por enfermedades causadas principalmente por virus como el virus del rizado amarillo de la hoja del tomate (TYLCV, siglas en inglés), el virus de la marchitez manchada del tomate (TSWV, siglas en inglés) y el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol). Por lo que su mejoramiento se ha centrado en la resistencia a estas enfermedades, sin descuidar rasgos importantes para productores y consumidores, como las características de calidad del fruto y el rendimiento. Dado que el tomate es susceptible a más de 200 patógenos, la obtención de materiales resistentes a enfermedades es crucial para el éxito de un cultivar de tomate y la selección asistida por marcadores moleculares (MAS, siglas en inglés) son una herramienta importante para lograrlo. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, siglas en inglés) es utilizada mundialmente para detectar marcadores moleculares asociados a genes resistentes, sin embargo, algunas de las modalidades de PCR como la PCR multiplex, necesitan ser optimizadas y evaluadas para demostrar su desempeño analítico, ya que muchos factores pueden afectarlas. Basado en lo descrito anteriormente, esta investigación tuvo como objetivo seleccionar nuevos cultivares de tomate resistentes a los patógenos TYLCV, TSWV y *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, asistido de marcadores moleculares y ensayos fenotípicos, generar protocolos de PCR multiplex para la detección conjunta de los marcadores moleculares asociados a genes de resistencia a patógenos en plantas de tomate que sean sensibles, específicos y repetibles. Para la optimización se utilizó un diseño compuesto central de una metodología de superficie de respuesta (RSM-CCD). Para la evaluación del rendimiento analítico, se analizaron la especificidad/selectividad y la sensibilidad (límite de detección y rango dinámico). Este método permitió desarrollar protocolos PCR multiplex optimizados con pocos ensayos, lo que se traduce en menos tiempo y recursos, sin sacrificar el rendimiento del método. Hemos encontrado que, en algunos híbridos de desarrollo avanzado analizados con estos protocolos, independientemente de la cantidad de genes resistentes presentes en los híbridos, estos genes no afectarían a la calidad de los frutos de tomate producidos por ellos, también encontramos que la mayoría de esos híbridos cumplían con los requisitos del mercado y además maduran temprano y con baja incidencia de Fol.

Palabras claves: *Solanum lycopersicum*; marcadores moleculares; genes de resistencia; protocolos; PCR multiplex; madurez temprana; calidad de la cosecha; inoculación; validación fenotípica.

ABSTRACT

In Mexico, the tomato is one of the primary export vegetables cultivated in most states of the country's northwest region, with Sinaloa being one of the largest producers. However, its production faces significant losses due to diseases primarily caused by viruses such as *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), and the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol). Therefore, improvement efforts have focused on resistance to these diseases while addressing important traits for producers and consumers, such as fruit quality and yield. Given that the tomato is susceptible to over 200 pathogens, obtaining disease-resistant materials is crucial for the success of a tomato cultivar, and molecular marker-assisted selection (MAS) is a vital tool for achieving this. Polymerase Chain Reaction (PCR) is globally used to detect molecular markers associated with resistant genes; however, some PCR modalities, such as multiplex PCR, need to be optimized and evaluated to demonstrate their analytical performance, as many factors can affect them. This research aimed to select new tomato cultivars resistant to the pathogens TYLCV, TSWV, and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, using molecular markers and phenotypic assays. It also sought to develop multiplex PCR protocols for simultaneously detecting molecular markers associated with pathogen resistance genes in tomato plants that are sensitive, specific, and reproducible. Optimization was performed using a central composite design from a response surface methodology (RSM-CCD). Specificity/selectivity and sensitivity (detection limit and dynamic range) were analyzed for analytical performance evaluation. This method allowed the development of optimized multiplex PCR protocols with fewer assays, reducing time and resources without sacrificing method performance. We found that resistance genes did not negatively impact the quality of the tomato fruits produced in some advanced development hybrids analyzed with these protocols. Additionally, most of these hybrids met market requirements, matured early, and had a low incidence of Fol.

Keywords: *Solanum lycopersicum*; molecular markers; resistance genes; protocols; multiplex PCR; early maturity; harvest quality; inoculation; phenotypic validation.

1. SINOPSIS

1.1. Justificación

La afectación de los cultivos de tomate por patógenos bacterianos, fúngicos, virales y nematodos pueden afectar notablemente los rendimientos, la calidad de los frutos, la vida útil y el contenido nutricional. En casos extremos, estas enfermedades obligan a los agricultores a abandonar por completo la producción de tomate. Además, en ausencia de cultivares resistentes, los agricultores a menudo dependen de plaguicidas para controlar estas enfermedades. Dichos productos químicos causan daño al medio ambiente, afectan la salud tanto de los productores como los consumidores y promueven el desarrollo de patógenos resistentes. Por lo que, como alternativa para reducir el daño causado por estos patógenos, lograr una agricultura sustentable y obtener productos de alta calidad en términos de seguridad alimentaria, se propone el uso de plantas resistentes. La implementación del uso de variedades resistentes como herramienta para reducir el daño ocasionado por patógenos puede lograrse mediante el mejoramiento genético asistido, el cual puede ser por medio de marcadores moleculares, que permiten identificar la presencia o ausencia de uno o más genes de interés en una planta, desde una etapa joven con respecto a los marcadores morfológicos, por lo que este procedimiento toma menos tiempo. La tecnología de los marcadores moleculares está constituida por poderosas metodologías que soportan a los programas de mejoramiento genético. La PCR múltiple proporciona un método relativamente fácil, rápido y confiable para la detección en conjunto de marcadores moleculares asociados con la presencia de genes de resistencia. Sin embargo, el éxito de este procedimiento depende en gran medida de la concentración de los componentes y las condiciones de termociclado de la reacción, siendo de suma importancia generar protocolos de PCR múltiples óptimos, validados e implementables para la detección de marcadores moleculares asociados genes de resistencia a patógenos en plantas de tomate, que sean específicos, sensibles y reproducibles. Permitiendo demostrar que son aptos para el propósito indicado. El desarrollo de estos protocolos podrá ser útil para una mejor selección de materiales resistentes por parte de los agricultores. Además, los protocolos optimizados podrán ser utilizados en futuros procedimientos de selección genética de líneas de tomate para el

mejoramiento genético de la especie.

El desarrollo de protocolos que permitan identificar marcadores moleculares asociados a genes de resistencia a enfermedades de manera específica, con alta sensibilidad y precisión pondrá la actual revolución de la ingeniería genética al servicio del desarrollo sostenible del país. El uso de estos protocolos permitirá superar las limitantes que inciden y limitan la producción del tomate en México. El mejoramiento genético asistido por marcadores moleculares promoverá la generación de productos de mejoramiento participativos. Esto permitirá contar con variedades que beneficien e incluyan a distintos tipos de unidades de producción agrícola en el país (familiares y de comunidades campesinas, pequeños, medianos y grandes productores). De la misma forma permitirá lograr una agricultura sustentable y obtener productos de alta calidad en términos de seguridad alimentaria. Y finalmente permitirá el fortalecimiento de la investigación pública, el mantenimiento de la diversidad genética y la recuperación de la soberanía alimentaria de la nación. Desde el punto de vista económica, el tratamiento que se realiza en el cultivo de jitomate, a fin de controlar las principales enfermedades que lo afectan, son principalmente con químicos, los cuales implican un costo dentro del paquete tecnológico del cultivo. Sin embargo, al desarrollar una metodología para generar marcadores moleculares que permitan identificar y seleccionar variedades resistentes, será posible reducir el uso de dichos químicos para el control de estos patógenos, reflejando una reducción en el costo del mantenimiento del cultivo. Con ello se contribuirá en la reducción de pérdidas económicas de los agricultores de este cultivo. Esto provocará costos más bajos para los consumidores, permitiéndoles un mayor poder de adquisición sobre el producto.

1.2. Antecedentes

1.2.1. Tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

Según la teoría de Jenkins (1948) el tomate fue cultivado primero por los aztecas. Su nombre “*tomatl*”, proviene del náhuatl, lengua hablada en algunas región de México, corresponde a

Physalis philadelphica; el jitomate propiamente dicho “*jitomatl*” corresponde a *S. lycopersicum*. La sección *Lycopersicon* del género *Solanum* contiene 13 subespecies: el jitomate cultivado, *S. lycopersicum*, que es la única especie domesticada, y 12 especies silvestres (Peralta *et al.*, 2008). Durante su domesticación la especie *S. lycopersicum* perdió gran parte de la diversidad genética presente en su ancestro silvestre (Tanksley y McCouch, 1997). A ello contribuyeron factores como la migración fuera de la zona de origen, la selección e introgresión de genes para obtener un elevado número de frutos bajo autofecundación y los cuellos de botella genéticos asociados a la domesticación y mejoramiento del cultivo (Rick, 1978; Giovannoni, 2018). Para recuperar estos genes es necesario el cruzamiento entre la variedad cultivada y especies silvestres que cuentan con los rasgos genéticos de interés tales como la resistencia tanto a factores abióticos como: la sequía, la luz ultravioleta, como a factores bióticos como; la resistencia a las enfermedades causadas por diferentes tipos de patógenos (Knudsen 2000, Engels y Visser 2007).

1.2.2. Interacción Hospedero-Patógeno

Las plantas no hospederas son completamente resistentes a los patógenos de otras plantas, por lo general incluso en las condiciones más favorables para el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, las mismas especies de plantas, que son no-hospederas para la mayoría de los patógenos son susceptibles, en menor o mayor medida, a sus propios patógenos. Además, cada especie de planta muestra una susceptibilidad específica hacia cada uno de sus propios patógenos, mientras que muestra una resistencia completa o no a todos los demás patógenos. Dentro de una especie de planta que es susceptible a una especie particular de patógeno, puede existir una variación considerable tanto en la susceptibilidad de los distintos cultivares de plantas (variedades) hacia el patógeno como en la virulencia de las distintas razas de patógenos hacia la variedad de planta. La genética de estas interacciones hospedero-patógeno es de considerable interés biológico y de suma importancia para el desarrollo de estrategias de control de la enfermedad mediante la mejora de la resistencia. La variación en la susceptibilidad a un patógeno entre las variedades de plantas se debe a los diferentes tipos y, quizás, a los diferentes números de genes de resistencia que pueden estar presentes en cada variedad. Los efectos de los genes de resistencia individuales varían de grandes

a diminutos, dependiendo de la importancia de las funciones que controlan. Una variedad que es muy susceptible a un aislado patógeno no tiene genes efectivos de resistencia contra ese aislado. Sin embargo, la misma variedad puede ser resistente a otro patógeno aislado obtenido de plantas infectadas de otra variedad (Agrios, 2005).

1.2.3. Mecanismo de Resistencia

La resistencia a las enfermedades controlada genéticamente por la presencia de uno o varios genes de resistencia en la planta se conoce como resistencia verdadera. En este tipo de resistencia, el hospedero y el patógeno son más o menos incompatibles entre sí, ya sea por la falta de reconocimiento químico entre el hospedero y el patógeno o porque la planta hospedera puede defenderse del patógeno. Los distintos mecanismos de defensa ya están presentes o se activan en respuesta a la infección por el patógeno. Hay dos tipos de resistencia verdadera: la resistencia parcial, también llamada cuantitativa, poligénica u horizontal, y la resistencia del gen R, también llamada específica de la raza, monogénica o resistencia vertical (Caro *et al.*, 2015; Gómez-Jaimes, 2011).

1.2.3.1 Tipos de resistencia. Todas las plantas tienen un cierto nivel, aunque no siempre el mismo, de resistencia posiblemente inespecífica que es eficaz contra cada uno de sus patógenos. Esta resistencia se denomina a veces parcial, inespecífica de la raza, general, cuantitativa, poligénica, de planta adulta, de campo o duradera, pero en el pasado se denominaba más comúnmente resistencia horizontal. La resistencia parcial está probablemente controlada por varios genes, de ahí el nombre de resistencia poligénica o multigénica; sin embargo, hay varios ejemplos de resistencia cuantitativa y no específica de raza que están determinados por un solo gen, a menudo homólogos del gen R. Además, en muchos casos en los que se realizaron análisis genéticos, un número limitado de genes, normalmente menos de cuatro o cinco, a menudo uno o dos, son suficientes para explicar la mayor parte de la resistencia. En muchos casos, uno de estos genes por sí solo puede ser bastante ineficaz contra el patógeno y puede desempeñar un papel menor en la

resistencia horizontal total (resistencia de genes menores) (Burbano-Figueroa, 2020).

En la resistencia horizontal los diversos genes implicados en esta resistencia parcial ejercen su influencia mediante el control de los numerosos pasos de los procesos fisiológicos de la planta que proporcionan los materiales y las estructuras que conforman los mecanismos de defensa de la planta. La resistencia parcial de una variedad de planta hacia todas las razas de un patógeno puede ser algo mayor, o menor, que las de otras variedades hacia el mismo patógeno, pero las diferencias suelen ser pequeñas e insuficientes para distinguir rutinariamente las variedades (resistencia no diferencial). Además, la resistencia parcial se ve afectada y puede variar considerablemente más que la resistencia del gen R bajo diferentes condiciones ambientales. Por lo general, la resistencia parcial no protege a las plantas de la infección. En cambio, retrasa el desarrollo de los loci de infección individuales en una planta, frenando así la propagación de la enfermedad y el desarrollo de epidemias en el campo. Algún grado de resistencia parcial está presente en las plantas, independientemente de que exista una resistencia monogénica. Sin embargo, aunque está claro que la resistencia parcial se hereda cuantitativamente, se cree que los genes individuales que contribuyen a la resistencia "parcial" pueden, de hecho, ser cualitativamente idénticos a los genes de la resistencia monogénica (Van Der Plank, 1966; Kil et al., 2016).

Muchas variedades de plantas son bastante resistentes a algunas razas de un patógeno mientras que son susceptibles a otras razas de este, un ejemplo es el caso de la planta de tomate (*Solanum lycopersicum*) y las tres razas del patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. En otras palabras, dependiendo de la raza del patógeno utilizada para infectar una variedad, esta puede parecer fuertemente resistente a una raza del patógeno y susceptible a otra raza (raza específica) bajo una variedad de condiciones ambientales. Esta resistencia diferencia claramente entre las razas de un patógeno, ya que es eficaz contra razas específicas del patógeno e ineficaz contra otras. Dicha resistencia se denomina a veces fuerte, mayor, específica de la raza, cualitativa o diferencial, pero en el pasado se denominaba más comúnmente resistencia vertical. La resistencia específica de la raza siempre está controlada por uno o unos pocos genes (de ahí los nombres de resistencia monogénica u oligogénica) (Van der Does et al., 2019).

La resistencia vertical en donde se encuentran los genes, denominados genes R, que controlan un paso importante en el reconocimiento del patógeno por parte de la planta hospedera y, por tanto, desempeñan un papel fundamental en la expresión de la resistencia. En presencia de la resistencia específica de la raza, el hospedero y el patógeno parecen incompatibles. El hospedero puede

responder con una reacción de hipersensibilidad, puede parecer inmune o puede inhibir la reproducción del patógeno. A menudo, la resistencia a una raza-específica inhibe el establecimiento inicial de los patógenos que llegan a un campo desde plantas hospedadoras que carecen de, o tienen diferentes, genes principales de resistencia. La resistencia específica de la raza inhibe el desarrollo de epidemias al limitar el inóculo inicial o al limitar la reproducción después de la infección. Por lo general esta resistencia es más duradera que la resistencia horizontal. Sin embargo, las plantas por lo general después de un tiempo se enferman (Van Der Plank, 1966).

Las plantas son resistentes a ciertos patógenos porque pertenecen a grupos taxonómicos que están fuera del rango de estos patógenos (resistencia a los no hospedadores), porque poseen genes de resistencia (genes R) dirigidos contra los genes de avirulencia del patógeno (verdadera, específica de la raza específica de la raza, o resistencia gen-por-gen), o porque, por diversas razones, las plantas escapan o toleran la infección por estos patógenos (resistencia aparente). Cada tipo de planta, por ejemplo, la patata, el maíz o el tomate, es un hospedero de patógenos que constituyen una pequeña proporción del número total de patógenos vegetales conocidos. En otras palabras, cada tipo de planta es un hospedero de la gran mayoría de los patógenos vegetales conocidos (Parlevliet y Zadoks, 1977).

En el hospedero, los genes de resistencia son dominantes (R), mientras que los genes de susceptibilidad, es decir, de falta de resistencia, son recesivos (r). En el patógeno, sin embargo, los genes de avirulencia, es decir, la incapacidad de infectar, suelen ser dominantes (A), mientras que los genes de virulencia son recesivos (a). Cuando se produce una mutación en el gen *avrA*, éste es incapaz de reconocer el gen R, por lo que se rompe el reconocimiento gen a gen. Entonces, los fitomejoradores introducen otra resistencia (R) en el hospedero que puede reconocer la proteína del nuevo gen de virulencia y amplía la resistencia del hospedero más allá de un nuevo rango del nuevo gen de avirulencia. Cuando una variedad tiene dos o más genes de resistencia (R1, R2, . . .) contra un determinado patógeno, significa que cada uno corresponde a uno, dos o más genes de antigua virulencia (y ahora de avirulencia) en el patógeno (a1, a2, . . .), cada uno de los cuales, una vez reconocido por uno de los genes de resistencia en el hospedero, funciona posteriormente como gen de avirulencia. Esto produce una variedad que es resistente a todas las razas que tienen un gen de avirulencia correspondiente al gen específico de resistencia hasta que aparece otro gen de virulencia en el patógeno. Cuando un gen específico para la resistencia aparece en el hospedero o se cría en él, el gen permite al hospedero reconocer el producto de un gen particular para la

virulencia en el patógeno. Ese gen del patógeno se considera entonces como el gen de "avirulencia" (*avrA*) del patógeno que corresponde al gen de resistencia de la planta R (Agrios, 2005; Chitwood-Brown, *et al.*, 2021).

1.2.4. Síntomas de los Patógenos en las Plantas

Cuando una planta es hospedera a un patógeno y no tiene genes de resistencia a este patógenos o el patógeno logra superar sus genes de resistencia, empiezan a aparecer algunos síntomas en esta planta que en algunos casos pueden permitir identificar qué tipo de patógeno la está afectando. En este caso, la susceptibilidad a estos tres patógenos; TSWV, el TYLCV y *Fol*, aparecen una gran variedad de síntomas.

1.2.4.1. Síntomas de TSWV. Las plantas susceptibles a TSWV muestran una amplia gama de síntomas, incluyendo manchas cloróticas anulares en las hojas, necrosis del pecíolo, anillos cloróticos y necróticos en los frutos, necrosis apical y pardeamiento, necrosis generalizada y marchitamiento. El TSWV es transmitido por los trips, en particular por el trips occidental de las flores (WFT; *Frankliniella occidentalis*) de la familia Thripidea. En condiciones naturales, la magnitud del problema del TSWV es directamente proporcional al tamaño de la población de trips. El control del vector es difícil porque los métodos físicos, químicos y biológicos de control no son muy eficaces. Pueden reducir las poblaciones de trips a niveles de daños directos económicamente viables, pero no lo suficiente como para evitar la propagación de la enfermedad. En consecuencia, el desarrollo de la resistencia genética se ha convertido en la mejor estrategia de gestión tanto a medio como a largo plazo, especialmente en el caso del TSWV (Anfoka, 2006).

1.2.4.2. Síntomas de TYLCV. Las plantas de tomate infectadas por el TYLCV muestran síntomas graves, como retraso en el crecimiento, reducción del tamaño de los folíolos que a su vez toman la forma de cuchara y/o enrollados, amarillamiento progresivo de la hoja que se generaliza con la

madurez, las flores se caen en grandes proporciones y los frutos son pequeños y poco numerosos, lo que causa la pérdida de producción crítica en el cultivo de tomate (Blancard *et al.*, 2011). TYLCV es un begomovirus monopartita perteneciente al género Begomovirus, y a la familia Geminiviridae, con un genoma de ADN circular de cadena única de 2.6-2.8 kb contenido en un virión con estructura icosaédrica, que se transmite por distintos vectores, pero principalmente por la mosca blanca *Bemisia tabaci*. Los viriones intactos pasan a través del canal de comida en el estilete de *B. tabaci* y alcanzan el esófago; luego se mueven a través del floema de la planta, cuando *B. tabaci* inserta su probóscide y se alimenta de hojas de tomate infectadas. Al ingresar a las células huésped vegetales, el ADN de TYLCV se replica a través de un mecanismo circular rodante (Ammara *et al.*, 2015; Geng *et al.*, 2018)

1.2.4.3. Síntomas de *Fol*. Los síntomas externos de *Fol* inician con el amarillamiento de las primeras hojas de manera ascendente, regularmente al inicio de la floración, extendiéndose a toda la planta y provocando clorosis que puede presentarse en las hojas de un sólo lado de la planta, y sólo en la mitad de éstas, después de algunos días las hojas se marchitan y mueren. En los tallos, el tejido vascular presenta una necrosis característica de color café en forma de anillo que se extiende hacia la parte apical de la planta conforme avanza la severidad de la enfermedad, provocando la muerte de la planta. Otros síntomas característicos de plantas adultas son achaparramiento, epinastia, amarillamiento y marchitez de las hojas y tallos jóvenes, defoliación y necrosis marginal de hojas, así como pudrición necrótica de las raíces laterales más pequeñas (Houterman *et al.*, 2009; Gonzalez-Cendales *et al.*, 2016).

La infección de esta enfermedad se realiza a través de heridas en raíces creciendo en suelo infectado y por medio de semillas infectadas, de esta manera pudiendo llegar a lotes nuevos, además, la maquinaria, el viento y agua son también vehículos de traslado. *Fol* sobrevive en restos de cultivo de una temporada a otra y posee estructuras de resistencia como las clamidosporas, las cuales son esporas de multiplicación vegetativa rodeadas de una pared gruesa y con sustancias nutritivas que garantizan la conservación del parásito en el suelo hasta por seis años. El ciclo de la enfermedad ocasionada por *Fol* se inicia con la presencia del inóculo en el suelo o residuos de cosecha, permaneciendo por tiempo indefinido (fase determinativa). El inóculo es constituido por hifas, esporas o clamidosporas que germinan cuando son activadas por exudados producidos en las raíces

fibrosas del tomate (fase determinativa). El micelio del inoculo se propaga por la corteza de la raíz y al llegar al xilema el micelio se ramifica y produce microconidios que se transportan de forma ascendente infectando el tallo y ápice. Al alcanzar el punto terminal, el micelio penetra la pared superior de los vasos, bloqueándolos y produciendo enzimas, toxinas y más microconidios en otros vasos para avanzar lateralmente por la planta y contribuir a la expresión de la enfermedad (Ascencio-álvarez *et al.*, 2008; Carmona *et al.*, 2020).

El desarrollo del patógeno es favorecido por las temperaturas cálidas asociadas a alta humedad relativa, donde el hongo es capaz de penetrar en la planta a nivel del suelo ya sea por el tallo o por las raíces superficiales y luego se traslada a través de los haces vasculares a toda la planta. Entre los principales métodos para el control de las enfermedades fúngicas, incluyendo la ocasionada por *Fol*; se encuentran estrategias que involucran prácticas culturales, el uso de agentes químicos, físicos y biológicos, así como el aprovechamiento de la resistencia genética natural en diferentes especies de tomate. El empleo de una estrategia en particular depende de diversos factores, desde condiciones edafoclimáticas de producción del tomate hasta los factores económicos (Blancard *et al.*, 2011).

1.2.5. Genes de Resistencia

Los genes de resistencia a patógenos más comunes son los de la clase NBS-LRR (Nucleotide-binding site–leucine-rich repeat, por sus siglas en inglés). Estos codifican proteínas que contienen un sitio de unión a nucleótidos (NBS) y una región rica en leucina (LRR). Las proteínas codificadas por los genes NBS-LRR reconocen los productos de los genes de avirulencia de los patógenos en células vegetales y activan respuestas de defensa de hipersensibilidad (Lavrova *et al.*, 2016). La resistencia en plantas puede ser expresada a través de un solo gen, que les confiere resistencia / tolerancia a un patógeno en específico, o a través de varios genes que les confiere resistencia a un mismo o a distintos patógenos (Gómez-Jaimes, 2011). Introgresar múltiples genes de resistencia en un mismo híbrido aumenta la eficacia y la durabilidad de la resistencia contra las enfermedades, pero es difícil de conseguir sin una selección asistida por marcadores dirigida a múltiples loci de resistencia (Vidavski *et al.*, 2008).

Algunos patógenos han desarrollado mecanismos para evitar ser reconocidos o bloquear la respuesta de defensa de la planta, para que ésta se convierta en su hospedero dando lugar a una interacción compatible. Por tal, los patógenos pueden secretar pequeñas moléculas conocidas como efectoras para suprimir la inmunidad del hospedero. Por su parte, el sistema inmune de la planta puede reconocer algunos de dichos efectores, los cuales cuando son reconocidos por la planta se denominan como proteínas de avirulencia (Avr).

1.2.5.1. Genes de resistencia a *Fol*. En *F. oxysporum*, la compatibilidad básica se establece a nivel de razas fisiológicas avirulentas o virulentas, y cultivares resistentes o sensibles. El repertorio de proteínas efectoras determina la virulencia de un patógeno hacia un hospedero particular. Se han identificado 11 proteínas denominadas secretadas en el xilema (SIX) que produce el hongo. Por su parte, las plantas de tomate resistentes a *Fol* contienen genes de resistencia específica a cada raza del patógeno, las cuales se han llamado *I* por genes de inmunidad, de las cuales confieren resistencia a la raza 1 (*I* e *I-1*), razas 1 y 2 (*I-2*), y razas 1 a 3 (*I-3* e *I-7*) de *Fol* (Van der Does *et al.*, 2019).

Con respecto a las proteínas de avirulencia del patógeno, tres de éstas son contrarrestadas por los genes *I* de tomate: Avr1 (SIX4) es reconocida por los genes *I* e *I-1* no alélico, Avr2 (SIX3) es reconocido por *I-2*; y Avr3 (SIX1) es reconocido por *I-3*. Avr2, Avr3 así como SIX6, son efectores únicos, y se ha encontrado que contribuyen con la virulencia general. Además, se ha encontrado que Avr1 no se requiere para la virulencia general, sino que tiene la función de suprimir a *I-2* e *I-3* de conferir resistencia contra cepas de la raza 1. Entre otros factores como el gen *fmk1* codifica para una MAPK que controla la formación de hifas especializadas en la infección, la adhesión a la raíz, la penetración y el crecimiento invasivo en la planta. La proteína *Fmk1* no es necesaria para la germinación, pero si lo es para la adherencia del hongo a la raíz y la diferenciación de las hifas de penetración, además es necesaria para la anastomosis o fusión vegetativa de hifas. También se ha demostrado que esa proteína regula el factor de transcripción *Ste12* y, por lo tanto, controla el crecimiento invasivo Catanzariti *et al.*, 2015; 2017).

El locus *I* se encontró en el cromosoma 11 en *S. pimpinellifolium* PI-79532, el locus *I-1* se localizó en el cromosoma 7 en *S. pennellii*, el locus *I-2* en el cromosoma 11 del híbrido natural de *S. lycopersicum* y *S. pimpinellifolium* PI-126915, y el locus *I-3* se localizó en el cromosoma 7 de *S.*

pennellii P1414773. Por su parte, más recientemente otro gen de resistencia fue encontrado en el cromosoma 8 de *S. pennellii* LA716 se trató del gen *I-7*. Este gen se encontró cercano al locus *I-3* y codifica para una proteína receptora con repeticiones ricas en leucina (LRR-RLP) que le confiere resistencia al tomate contra las razas 1, 2 y 3 de *Fol* (Gonzalez-Cendales *et al.*, 2016).

1.2.5.2. Genes de resistencia a TYLCV. En el caso de TYLCV Las medidas de prevención se centran en el control de la mosca blanca y se basan en tratamientos por insecticidas y/o el uso de barreras físicas. Las medidas de control de la mosca blanca, por lo general son: el uso de pantallas de plástico absorbentes de UV, pantallas de malla fina o películas e insecticidas. Estos métodos de control pueden limitar el daño de la enfermedad, pero aún se pueden ocurrir las epidemias. Además, se ha reportado resistencia de la mosca blanca a los químicos usados. El método de control más eficiente hasta el momento es el uso de plantas resistentes (Al Abdallat *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2014).

Hasta la fecha, se han mapeado y descrito seis genes de resistencia / tolerancia de TYLCV, desde Ty-1 a Ty-6 (Caro *et al.*, 2015). Ty-1 y Ty-3 fueron introgresados desde *S. chilense* (Accesiones NCBI: LA1960 y LA2779) y fueron localizados en el brazo largo del cromosoma 6 (Zamir *et al.*, 1994; y Ji *et al.*, 2007). Zamir y colaboradores (1994), mapearon el gen *Ty-1* cerca del marcador TG97 alrededor del gen *Mi* (5,5 cM). Aproximadamente a 15 cM o más del locus *Ty-1*, Ji y colaboradores (2007), mapearon el gen *Ty-3* al intervalo del marcador cLEG31-P16 (20 cM) – T0179 (27 cM), por lo que sugirieron la posible coexistencia y vinculación de los alelos de resistencia en ambos loci *Ty-1* y *Ty-3* en estas líneas. Mientras Verlaan y colaboradores (2011, 2013), mencionaron que son dos alelos del mismo gen que se encuentra en el brazo largo del cromosoma 6 del tomate y codifica una ARN polimerasa dependiente de ARN (RDR); el locus *Ty-2*, originado en *S. habrochaites*, fue mapeado en el brazo largo del cromosoma 11 (Yang *et al.*, 2014; y Yamaguchi *et al.*, 2018); el locus *Ty-4*, proveniente también de *S. chilense*, fue ubicado en el brazo largo del cromosoma 3 (Ji *et al.*, 2009); el locus *Ty-5* proveniente de *S. peruvianum* (Accesión NCBI: LA1589) se localizó en el cromosoma 4 (Anbinder *et al.*, 2009); y finalmente, *Ty-6* es el locus de resistencia a TYLCV identificado más recientemente en el brazo largo del cromosoma 10 proveniente de *S. pimpinellifolium* (Gill *et al.*, 2019).

Para fines de mejoramiento genético a nivel internacional hasta ahora, las estrategias han sido las

introgresiones de *Ty-1*, *Ty-2* y *Ty-3* en el tomate cultivado (Yan *et al.*, 2018).

1.2.5.3. Genes de resistencia a TSWV. Igual que en el caso de TYLCV, en el caso de TSWV las estrategias de control utilizadas se basan en el vector para limitación del daño en el cultivo y se hace antes de la floración, ya que una vez que ocurra la infección por el virus es difícil de controlarla. Se aplican insecticida de amplio espectro, al término del cultivo anterior para controlar el vector en el invernadero. Una infestación temprana de virus genera las mayores pérdidas en el cultivo. Por lo que el uso de insecticida neonicotinoide en la inmersión de bandeja o en drench al día siguiente del trasplante ayuda a evitar infestación temprana. Otra alternativa de control es el uso de variedades resistentes (Anfoka 2006).

Se ha reportado resistencia al TSWV en parientes silvestres como *Solanum peruvianum*, *S. pimpinellifolium*, *S. habrachaites* y *S. chilense*. La primera fuente de resistencia al TSWV se encontró en *S. pimpinellifolium*. A lo largo de los años, se han identificado siete loci de resistencia al TSWV, designados como los dominantes y alélicos *Sw 1a* y *Sw-1b*; tres genes recesivos: *sw-2*, *sw-3* y *sw-4*; y tres genes dominantes: *Sw-5*, *Sw-6* y *Sw-7*. *Sw-5*, originalmente introducido en el cultivar 'Stevens', de *S. peruvianum* en la década de 1960 y es actualmente la principal fuente de resistencia al TSWV en las variedades comerciales de tomate de todo el mundo. *Sw-5* está localizado en la región telomérica del brazo largo del cromosoma 9 estrechamente vinculado a los marcadores RFLP CT220 y SCAR421 (Folkertsma *et al.*, 1999). Debido a su gran tamaño se necesita un marcador, el cual actúa como una bandera o un código que permite identificar los genes de resistencia. Las propiedades ideales de un marcador son: Fácil de usar y de bajo costo, de naturaleza altamente reproducible y polimórfica, la diferencia de alelos debe medirse claramente y distribución equitativa en todo el genoma. Los diferentes tipos de marcadores que pueden usar para detectar un gen son los marcadores bioquímicos, morfológicos y biológicos. Dentro de los marcadores biológicos se encuentran los marcadores moleculares y son los que se utilizan en este trabajo de investigación para detectar los genes de resistencia.

1.2.6. Los Marcadores Moleculares

También conocidos como marcadores de ADN, son uno de los tres tipos de marcadores genéticos que permiten identificar diferencias genéticas entre organismos o especies individuales. A diferencia de los marcadores morfológicos que son rasgos o caracteres fenotípicos y los marcadores bioquímicos que son variantes alélicas de enzimas (isoenzimas), los marcadores de ADN revelan sitios de variación en el ADN (Raiz *et al.*, 2020). Cabe mencionar que generalmente los marcadores moleculares no representan los genes diana en sí mismos, sino que actúan como "señales" o "banderas" para identificar la presencia de dichos genes. Por lo que la selección asistida por marcadores moleculares (MAS) permite seleccionar a un rasgo en función del genotipo de un marcador asociado, en lugar del rasgo en sí. Su potencial para el mejoramiento de cultivos ha sido ampliamente explorado (Hanson *et al.*, 2016; y Lenaerts *et al.*, 2019).

Los marcadores moleculares se basan fundamentalmente en el polimorfismo presente entre las secuencias de nucleótidos de diferentes individuos. El marcador molecular puede diseñarse a partir del gen de interés o de una secuencia de ADN que no sea parte del gen pero que se encuentre ligada a él. Los marcadores moleculares revelan sitios de variación en el ADN, son los más utilizados en el análisis del germoplasma vegetal; debido a su abundancia son generados por diferentes tipos de mutaciones en el ADN así como mutaciones por sustitución (puntuales), reordenamientos (inserciones o deleciones), traslocaciones o errores en la replicación del ADN en tándem y son selectivamente neutros debido a que usualmente se localizan en regiones no codificantes del ADN (Foolad, 2007; Ahmad *et al.*, 2020).

1.2.6.1. Clasificación de los marcadores moleculares. Los marcadores moleculares pueden clasificarse de acuerdo con diversos criterios: 1) por el modo de acción, como codominantes o dominantes; 2) por el método de detección, como marcadores basados en PCR o basados en hibridación; o 3) por el modo de transmisión como herencia paterna o materna de organelos, herencia nuclear biparental o herencia nuclear materna. En el caso del modo de acción, los marcadores codominantes permiten distinguir entre genotipos homocigos y heterocigos, mientras que un marcador dominante solo proporciona información acerca de la presencia del marcador,

pero no distingue si se encuentra en homocigosis o heterocigosis. Un marcador molecular de ADN ideal debe reunir ciertas características para maximizar su utilidad, entre las cuales debe ser codominante, distribuido uniformemente en todo el genoma, altamente reproducible y tener la capacidad de detectar un alto nivel de polimorfismo (Almeida y Gratero, 2021).

1.2.6.2. Tipos de marcadores moleculares. Durante las últimas dos décadas, se han desarrollado y evolucionado diferentes tipos de marcadores moleculares, entre los que incluyen: polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), número variable de repeticiones en tándem (VNTR o minisatélites), polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP); repeticiones de secuencia simple (SSR o microsatélites), ADN polimórficos amplificados al azar (RAPD), polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), secuencias polimórficas amplificadas escindidas (CAPS) y regiones amplificadas de secuencias caracterizadas (SCAR) (Foolad, 2007; y Riaz *et al.*, 2020). Algunos de los marcadores moleculares más utilizados en el mejoramiento genético son:

Los RAPD, técnicas de reacción en cadena de la polimerasa modificada que involucran múltiples oligonucleótidos. Los marcadores de ADN amplificados resultantes son segmentos polimórficos aleatorios con tamaños de banda de 100 a 3,000 pb, dependiendo del ADN genómico y el cebador (Li *et al.*, 2010). Estos marcadores son dominantes, es decir, no pueden discernir los homocigotos dominantes de los heterocigotos para un segmento particular. Los RAPDs amplifican aleatoriamente segmentos de ADN en una gran variedad de especies y son útiles en la elaboración de mapas genéticos y el diseño de otros cebadores. Sin embargo, una de sus desventajas es su bajo nivel de reproducibilidad (Miroslava-Rentaria, 2000; y Riaz *et al.*, 2020).

Los CAPS, visualizan las diferencias en la longitud de los fragmentos de restricción causados por los SNP que crean o anulan los sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción en los amplicones de PCR (Li *et al.*, 2010). La necesidad de realizar una restricción después de la PCR para visualiza diferencias entre alelos, es una desventaja para la detección en conjunto de estos marcadores.

Los SCAR, fragmentos de ADN amplificados mediante el uso de cebadores específicos de 15-30 pb. Se utilizan tanto para solucionar el problema de reproducibilidad de los marcadores tipos RADPs como para reducir las complicaciones, el tiempo de desarrollo y costo de los marcadores tipos RFLPs y AFLPs. Estos se desarrollan a partir de clonación y secuenciación de marcadores

RAPD específicos y del análisis de las secuencias de los marcadores RFLPs y AFLPs (Collard *et al.*, 2005; Felici *et al.*, 2008; y Park *et al.*, 2013).

Los SSR, marcadores codominantes basados en repetición de di, tri y tetra nucleótidos encontrados en el genoma de las plantas. Estos se utilizan ampliamente debido a que se necesitan pequeñas cantidades de ADN para su detección, el bajo costo de los ensayos, y la genotipificación de alto rendimiento (Riaz *et al.*, 2020).

1.2.6.3. Marcadores Moleculares Ligados a Genes de Resistencia al TYLCV. La identificación de fuentes de resistencia al TYLCV y su introgresión en los cultivares comerciales e híbridos no comerciales ha estabilizado la producción de tomate en áreas y temporadas propensas a enfermedades (Dhaliwal *et al.*, 2020). En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se muestran marcadores moleculares de diferentes tipos ligados a diferentes genes de resistencia al TYLCV.

Cuadro 1. Marcadores de resistencia a TYLCV, tipos y genes asociados.

Genes	Marcadores ligados	Tipos de marcadores	referencias
<i>Ty-1</i>	TG97 hasta TG25	RFLP	Zamir <i>et al.</i> (1994)
<i>Ty-1/3</i>	M2 y <i>Ty-1/3_K</i>	SCAR	Chen <i>et al.</i> (2015)
<i>Ty-2</i>	TG36 hasta TG393	RFLP	Hanson <i>et al.</i> (2006)
	TES0344	SSR	Yang <i>et al.</i> (2012)
	T0302	SCAR	Garcia <i>et al.</i> (2007)
<i>Ty-3</i>	P6-25 y FLUW25	SCAR	Ji <i>et al.</i> (2007)
<i>Ty-5</i>	AVRDC-TM273	SSR	Chen <i>et al.</i> (2015)

Fuente: (Chen *et al.*, 2015; Dhaliwal *et al.*, 2020)

1.2.6.4. Marcadores moleculares ligados a genes de resistencia al Fol. Los cebadores asociados al gen *I-1* fueron diseñados para amplificar sólo en variedades con resistencia. Uno de ellos, el cebador reverso homólogo se une a los 7 pb adicionales presentes en materiales con resistencia y el otro cebador ancla en una región común en resistentes y susceptibles. Por otro lado, los marcadores asociados los genes *I-2* e *I-3* discriminan materiales por bandas asociadas a

susceptibilidad o resistencia (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) (Pérez-Ameida *et al.*, 2016).

Cuadro 2. Marcadores de resistencia a *Fol* tipos y genes asociados.

Genes	Marcadores vinculados	Tipos de marcadores	referencias
<i>I-1</i>	At2-F3 - R3	SCAR	Arens <i>et al.</i> (2010)
<i>I-2</i>	I-2/5F/5R	SCAR	Yu & Zou (2008)
<i>I-3</i>	P7-43DF1/R1 - DF3/R1	SCAR	Barillas <i>et al.</i> (2008)

1.2.6.5. Marcadores Moleculares Vinculados a Genes de Resistencia a TSWV. Los cebadores específicos para el locus Sw-5 para su uso en la PCR validados en una serie de genotipos de tomate con diferentes antecedentes genéticos, demuestran que pueden ser utilizado con éxito para la selección de plantas resistentes al TSWV en la mejora del tomate (Cuadro 3) (Stevens *et al.*, 1995).

Cuadro 3. Marcadores de ADN resistentes a TSWV y genes asociados.

Marcadores	Tipo de marcadores	Patógenos	<i>Gen</i>	Cebadores	Referencias
Sw5-2 SCAR F Sw5-2 SCAR R	SCAR	TSWV	<i>Sw5</i>	AATTAGGTTCTTGAAGCCCATCT TTCCGCATCAGCCAATAGTGT	Dianese <i>et al.</i> (2010)
Sw5b SCAR F Sw5b SCAR R	SCAR	TSWV	<i>Sw5b</i>	CGGAACCTGTAAGTTGACTG GAGCTTCATCCATTTTCCG	Shi <i>et al.</i> (2011)

Los marcadores moleculares se detectan con técnicas como: la restricción y PCR, las cuales hacen posible analizar la variación en la molécula del ADN, siendo la PCR la más utilizadas para identificar marcadores moleculares (Velázquez Alejos *et al.*, 2010). Esta técnica, por la que su creador, Kary Mullis obtuvo el Premio Nobel en el año 1993, amplifica exponencialmente cualquier segmento de ADN de secuencia conocida.

1.2.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa

La invención de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido un hito en la historia de las

ciencias biológicas. Las aplicaciones de PCR han revolucionado por completo la investigación en el campo de la genética molecular y la biotecnología animal y vegetal. La PCR convencional condujo a la aparición de transcripción inversa-PCR (RT-PCR), PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR) y RT-PCR /q-PCR combinadas (Singh *et al.*, 2014).

1.2.7.1 Multiplex-PCR o PCR múltiples. Utiliza conjuntos de cebadores dentro de una única mezcla de PCR para producir amplicones de diferentes tamaños. Esta variante de PCR, apunta a múltiples marcadores o genes a la vez en una sola prueba que de otra manera requeriría usar varias veces los reactivos y más tiempo para funcionar. Los amplicones se visualizan mediante electroforesis en gel en el caso de multiplex PCR punto final o tintes intercalados como EVA Green y SYBR Green I en Multiplex PCR en tiempo real (Multiplex qPCR) (Hayden *et al.*, 2008). Tanto la Multiplex-PCR punto final como la de tiempo real se ha aplicado con éxito en la detección de secuencias de ADN. Las PCR multiplex han sido ampliamente utilizados para la detección en conjunto de los marcadores moleculares.

La PCR multiplex proporciona un método relativamente fácil, rápido y preciso para la detección de secuencias específicas de ADN. Sin embargo, el éxito de los métodos de detección basados en la PCR depende en gran medida de los componentes de la reacción de PCR y de las condiciones de amplificación, por lo que la optimización es crucial para obtener datos fiables y reproducibles (Lorenz, 2012).

1.2.8. Optimización

La optimización constituida por un conjunto de resultados, métodos analíticos y numéricos enfocados a encontrar e identificar al mejor candidato entre una colección de alternativas, sin tener que enumerar y evaluar explícitamente todas esas alternativas. Las técnicas de optimización de cualquier proceso se enfocan en determinar el procedimiento a seguir, para maximizar o minimizar la variable respuesta. La optimización está limitada por una serie de restricciones que reducen la cantidad de alternativas posibles, definiendo un espacio acotado de soluciones factibles. Dentro de

las soluciones factibles, pueden existir una o más soluciones óptimas, es decir, aquellas que, además de cumplir con todas las restricciones, maximizan (o minimizan, según sea el problema por resolver) el valor de la función objetivo (Baquela y Redchuk, 2013). Hay una técnica llamada técnica de una variable a la vez que permite determinar las condiciones óptimas de una operación mientras se mantienen los otros en un nivel constante. Pero tiene una desventaja no incluye los efectos de las interacciones entre las variables, por lo que no representa los efectos completos de los parámetros en el proceso. Para superar este problema, se utiliza la metodología de superficie de respuesta (*RSM*) para llevar a cabo los estudios de optimización (Bas y Boyaci, 2007).

1.2.8.1. Metodología de superficie respuesta (*RSM*). Existen varios lenguajes de modelado dentro de los cuales actualmente ya existen componentes orientados a objetos dedicadas exclusivamente a optimización tales como; *Concert* de ILOG, *OptiMax 2000* de *maximal software* y programas estadísticas tales como SPSS y MINITAB que permiten desarrollar modelos de optimización (Ramos *et al.*, 2010). *RSM* es un procedimiento secuencial generalmente aplicado para determinar las condiciones operativas óptimas para un proceso y es una combinación de técnicas estadísticas y matemáticas para el modelado y análisis de problemas, con el objetivo de comprender la influencia de las variables del proceso en las respuestas y optimizar estas respuestas (Singh Boparai *et al.*, 2016). La *RSM* es el método de optimización más utilizado en los últimos años. Existen muchos trabajos basados en su aplicación en procesos químicos y bioquímicos, pero es poco utilizado en el área de biología molecular.

1.2.8.2. Optimización de PCR. Optimizar un proceso de reacción en de cadena de la polimerasa es encontrar las mejores condiciones en las cuales la amplificación del fragmento deseado es máxima. Mogni *et al.*, (2016) optimizaron un protocolo de PCR para amplificar cloroplastos y regiones nucleares útiles para el análisis filogenético molecular en *Schinopsis* spp. y otras anacardiáceas adicionaron de BSA 1/1000; MgCl₂ 5 mM y DMSO 1 M en la mezcla de PCR y amplificaron productos de PCR pudieron secuenciar directamente, sin necesidad de aislamiento, purificación y clonación. Félix Urquídez *et al.*, (2016) desarrollaron y optimizaron mediante un diseño central compuesto un ensayo de PCR digital de gota doble (*ddPCR*) y encontraron las condiciones óptimas

para la caracterización los candidatos de Materiales de Referencia Certificados por sus contenidos de relación de número de copias *T-nos/hmg*.

1.2.9. Validación

La optimización es uno de los requerimientos más importante precedente a la validación de cualquier secuencia de pasos dispuesta con algún tipo de lógica que se enfoca en lograr algún resultado específico. Para que un método optimizado sea confiable es necesario que sea validado. El objetivo de la validación de un procedimiento analítico es demostrar que es apto para el propósito indicado (ICH-Harmonised-tripartite-guideline, 2005). Implica que se debe demostrar que el método garantiza la confiabilidad en la detección de una muestra positiva y no falsos positivos (Molina 2015). Para validar un método cualitativo de PCR es necesario seguir en la medida de los posibles la metodología de los análisis habituales tales como:

1.2.9.1. Especificidad. Es la capacidad de un método para medir correctamente un analito dado y distinguir compuestos de estructura estrechamente relacionada dentro de la muestra sin interferencia de componentes no objetivo (ISO 16140:2003).

1.2.9.2. Límite de detección. Es la concentración en la que una muestra positiva arroja resultados positivos en al menos el 95% de las ocasiones (ISO 16140:2003).

1.2.9.3. Selectividad. Es una medida del grado de no interferencia en presencia de analitos no objetivo. Un método es selectivo si y solo si al ser usado para detectar un analito proporciona una garantía de que la señal detectada es el producto de ese analito en específico (ISO 16140:2003).

Inclusividad es la capacidad de un método para detectar el analito objetivo de una amplia gama de muestras (ISO 16140:2003).

Exclusividad es la no interferencia de un rango relevante de muestras no objetivo al método (ISO 16140:2003).

1.2.9.4. Rango dinámico. Es el intervalo dentro del cual el analito es detectable (ISO 16140:2003).

1.2.9.5. Repetibilidad. Es la variación causada por el dispositivo de medición. Se observa cuando el mismo operador mide la misma parte muchas veces, usando el mismo sistema de medición, bajo las mismas condiciones (González-Rey, 2015).

1.2.9.6. Reproducibilidad. Es la variación causada por el sistema de medición. Se observa cuando diferentes operadores miden la misma parte muchas veces, usando el mismo sistema de medición, bajo las mismas condiciones (González-Rey, 2015).

1.2.10. Calidad de los Frutos del Tomate

El tomate es susceptible a más de 200 plagas y patógenos; la obtención de resistencias adecuadas a las enfermedades es crucial para el éxito de un cultivar de tomate (Lukyanenko 1991, Bergougnoux 2014). Sin embargo, a menos que una zona de producción esté sometida a una alta presión de enfermedades, no es probable que la resistencia por sí sola haga que un cultivar tenga éxito. Los productores de tomate deben producir frutos que satisfagan las demandas del mercado y cumplan las normas de la industria para obtener beneficios y, en circunstancias normales, un nuevo híbrido con resistencia a las enfermedades debe tener un rendimiento al menos comparable al de los híbridos susceptibles existentes con respecto a los rasgos de calidad del fruto, el rendimiento y otras características críticas (Chitwood-Brown *et al.*, 2021). Debido a esto el fitomejoramiento del tomate se ha centrado en mejorar los rasgos importantes para productores y consumidores, tanto la resistencia a enfermedades, como las características de calidad del fruto y el rendimiento.

1.2.10.1. Producción y maduración del tomate. La mayoría de los frutos de tomate producido en

México son exportado a Estados Unidos de América y a Canadá. Estos dos países demandan frutos de alta calidad, lo que representa un reto para las empresas productoras mexicanas (Detweiler *et al.*, 2014). La fecha de madurez de los frutos de tomate puede ser un factor importante para definir el precio de estos frutos en el mercado. Los frutos de variedades de tomate de maduración ultratemprana y temprana (60-75 días después de la siembra) con características de buena calidad tienden a tener mayor precio si se cosechan en tiempo de escases del producto (USDA, 2023). Se ha sabido que los tomates no pueden almacenarse durante largos periodos, lo que obliga a los productores a abastecer la demanda con la producción actual. Esto hace que los precios aumenten cuando la oferta es escasa (meses de invierno) y disminuyan cuando la oferta es abundante (meses de verano) (FAOSTAT 2023, Ascencio-Álvarez 2008).

Además de las tendencias estacionales, los precios del tomate también pueden ser muy variables a lo largo de la temporada de cosecha, lo antes señalado puede ser debido a las afectaciones del cultivo por los patógenos mencionados anteriormente, como TYLCV, TSWV y *Fol* (Al Abdallat *et al.*, 2010, Lugo-Melchor *et al.*, 2011, Francis, 1995). Estos patógenos pueden llegar a causar el 100% de pérdida cuando logran establecerse en un invernado o un compa de producción de tomate. Es debido a los efectos de las variaciones estacionales y las pérdidas causadas por los patógenos en los mercados y sus efectos en los ingresos de los productores los que obliguen a buscar híbridos de tomate resistentes a patógenos que produzcan frutos de maduración temprana y buena calidad.

1.2.10.2. Parámetros de calidad. Todos los parámetros que definen la calidad del tomate son muy importantes para su valor en el mercado. Según (Herregods, 1998), el color externo es una de las características más importantes de la calidad de cualquier producto ya que lo primero que tienen en cuenta los consumidores a la hora de comprar un producto es el aspecto visual, en el caso del tomate, para el consumidor, el color rojo es un indicador de calidad gustativa. Por este motivo, los mercados suelen adoptar medidas para mejorar la calidad externa de los productos como: recubrimiento de cera, envases buenos e innovadores, etc. Aunque estas medidas pueden ser de gran ayuda en las primeras ventas, el aumento o disminución de las ventas posteriores depende de la calidad interna del fruto (A.O.A.C. 1998), tales como, color interno, pH, acidez titulable, sólidos solubles totales (SST), relación SST/acidez y firmeza de la pulpa (Lafrance *et al.*, 2023).

1.2.10.3. Validación fenotípica. En ocasiones un marcador molecular puede detectar un gen de resistencia en una planta, pero este no se está expresando, lo que significa que aún con la presencia del gen de resistencia, la enfermedad continúa causando daños a la planta. Por ello, es importante realizar una validación fenotípica tras detectar un gen resistente en un nuevo híbrido. Anfoka y Styvens (2006) evaluaron la respuesta fenotípica, mediante la infección controlada con aislados de TSWV jordano (TSWV-Jo), de algunas líneas mejoradas de tomate desarrolladas para la resistencia TYLCV con el objetivo de observar si existe alguna relación entre la resistencia que proporciona los genes asociados a la resistencia a TYLCV y los genes asociados a la resistencia a TSWV. Encontraron que todas las líneas probadas eran susceptibles a la infección por TSWV. Confirmaron sus resultados a nivel molecular utilizando el marcador SCAR 421 vinculado al gen de resistencia al TSWV Sw-5. Por lo que concluyen que los genes de resistencia a TYLCV no proporcionan resistencia a TSWV.

1.3 Hipótesis

- 1.- Mínimo dos protocolos de PCR multiplex son necesarios para detectar los cinco marcadores moleculares asociados a los genes de resistencia del tomate a los patógenos *Tomato yellow leaf curl virus*, *Tomato spotted wilt virus* y *F. oxysporum* con buen desempeño analítico.
- 2.- Las mejores condiciones de multiplex PCR para detectar los marcadores moleculares asociados a los genes de resistencia del tomate a los patógenos *Tomato yellow leaf curl virus*, *Tomato spotted wilt virus* y *F. oxysporum* que lo afectan, se encuentran dentro de la región experimental obtenida.
- 3.- Los protocolos de PCR multiplex optimizados presentan alta sensibilidad, especificidad y precisión, para seleccionar materiales de tomate que contienen los genes asociados a la resistencia del tomate a *Tomato yellow leaf curl virus*, *Tomato spotted wilt virus*, y *F. oxysporum*.
- 4.- Los materiales de tomates en desarrollo que contienen los genes de resistencia mantienen al menos la misma calidad que los comerciales.
- 5.- Los materiales de tomate que presentan los genes asociados a la resistencia a *Tomato yellow*

leaf curl virus, *Tomato spotted wilt virus* y *F. oxysporum*, tiene nivel de resistencia/ tolerancia alta.

1.4. Objetivo General

Optimizar, validar e implementar protocolos de PCR múltiples para la detección rápida, sensible y específica de un conjunto de marcadores moleculares asociados a la resistencia del tomate a los patógenos TYLCV, TSWV y *Fol*, para seleccionar cultivares de tomate de calidad comercial que muestren fenotipo de resistentes a estos patógenos.

1.5. Objetivos Específicos

- 1.- Desarrollar protocolos basados en PCR multiplex, utilizando marcadores tipo SCAR y SSR, asociados a la resistencia del tomate a los patógenos TYLCV, TSWV y *Fol*.
- 2.- Optimizar mediante una metodología de superficie de respuesta (RSM) los protocolos basados en multiplex PCR para detectar los marcadores asociados a los genes de resistencia del tomate a TYLCV, TSWV y *Fol*.
- 3.- Evaluar el desempeño analítico (sensibilidad, especificidad y precisión) de los protocolos de PCR múltiple optimizados para detectar los marcadores asociados a la resistencia del tomate a los patógenos TYLCV, TSWV y *Fol*.
- 4.- Evaluar los atributos de la calidad de los frutos de materiales de tomate en desarrollo que contienen los genes de resistencias a diferentes fitopatógenos.
- 5.- Determinar el comportamiento de resistencia o susceptibilidad de plantas de tomate desarrolladas Sinaloa, inoculadas con *Fol*.

1.6. Sección Integradora del Trabajo

La información presente en este documento está dividida en seis capítulos, de los cuales, tres corresponden a los artículos científicos (Capítulos 2, 3 y 4) que abordan los objetivos de esta investigación.

El primer capítulo de este trabajo consiste en una sinopsis que aborda el origen histórico del tomate, su importancia tanto en el mercado nacional como internacional, algunos de los principales patógenos que los afectan y por último los mecanismos de selección de híbridos resistentes a estos patógenos y control de calidad de los frutos producidos por dichos híbridos y la validación fenotípica de la resistencia detectada molecularmente en estos híbridos.

El segundo capítulo corresponde al primer manuscrito científico “Response surface methodology for optimization of multiplex-PCR protocols for detection of TYLCV, TSWV and Fol molecular markers: analytical performance evaluation” el cual aborda los tres primeros objetivos de investigación que consistió en desarrollar, optimizar y evaluar protocolos de PCR múltiple, utilizando marcadores tipo SCAR y SSR, asociados a la resistencia del tomate a los patógenos TYLCV, TSWV y Fol.

El tercer capítulo, comprende el artículo “Selection of tomato (*Solanum lycopersicum*) hybrids Resistant to Fol, TYLCV, and TSWV with early maturity and good fruit quality”, este trabajo de investigación abordó el objetivo 4, el cual consistió en evaluar los atributos de la calidad de los frutos de materiales de tomate en desarrollo que contienen los genes de resistencias a diferentes fitopatógenos. Con los resultados de esta investigación se confirma que estos híbridos en desarrollo producen frutos que mantienen los estándares de calidad demandados por los mercados internacionales.

En el cuarto capítulo, se presenta el artículo “Behavior of tomato plants developed in Sinaloa inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*”. En dicha investigación se abordó el objetivo 5, el cual consiste en determinar el comportamiento de resistencia o susceptibilidad de plantas de tomate desarrolladas en Sinaloa, inoculadas con este patógeno. Con los resultados de esta investigación se destacaron los híbridos de tomate con índice de severidad inferior al 10%, y la importancia de usarlos en futuros trabajos de mejoramiento genético.

2.RESPONSE SURFACE METHODOLOGY FOR OPTIMIZATION OF MULTIPLEX-PCR PROTOCOLS FOR DETECTION OF TYLCV, TSWV AND *Fol* MOLECULAR MARKERS: ANALYTICAL PERFORMANCE EVALUATION

Richecarde Lafrance ¹, José Benigno Valdez-Torres ¹, Claudia Villicaña ², Raymundo Saúl García-Estrada ¹, Mayra Janeth Esparza-Araiza ³ and Josefina León-Félix ^{1,*}

¹ Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), A.C., Culiacán 80110, Sinaloa, Mexico; rlafrance220@estudiantes.ciad.mx (R.L.); jvaldez@ciad.mx (J.B.V.-T.); rsgarcia@ciad.mx (R.S.G.E.)

² CONACYT-Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Culiacán 80110, Sinaloa, Mexico; maria.villicana@ciad.mx

³ Centro de Innovación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria de Sinaloa-Fundación Produce Sinaloa, A.C., Aguaruto 80308, Sinaloa, Mexico; mayjanes11@gmail.com

* Correspondence: ljosefina@ciad.mx

Revista:

Genes

Publicado el:

28 de enero del 2023

DOI:

<https://doi.org/10.3390/genes14020337>

Article

Response Surface Methodology for Optimization of Multiplex-PCR Protocols for Detection of TYLCV, TSWV and *Fol* Molecular Markers: Analytical Performance Evaluation

Richecarde Lafrance ¹, José Benigno Valdez-Torres ¹, Claudia Villicaña ² , Raymundo Saúl García-Estrada ¹ , Mayra Janeth Esparza-Araiza ³  and Josefina León-Félix ^{1,*} 

¹ Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), A.C., Culiacán 80110, Sinaloa, México

² CONACYT-Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Culiacán 80110, Sinaloa, México

³ Centro de Innovación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria de Sinaloa- Fundación Produce Sinaloa, A.C., Aguascalientes 80308, Sinaloa, México

* Correspondence: ljosefina@ciad.mx



Citation: Lafrance, R.; Valdez-Torres, J.B.; Villicaña, C.; García-Estrada, R.S.; Esparza-Araiza, M.J.; León-Félix, J. Response Surface Methodology for Optimization of Multiplex-PCR Protocols for Detection of TYLCV, TSWV and *Fol* Molecular Markers: Analytical Performance Evaluation. *Genes* **2023**, *14*, 337. <https://doi.org/10.3390/genes14020337>

Academic Editor: Piero Fariselli

Received: 27 October 2022

Revised: 17 December 2022

Accepted: 18 January 2023

Published: 28 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Molecular markers linked to disease resistance genes which affect economically important crops are of great interest. In the case of tomato, a major focus on resistance breeding to multiple fungal and viral pathogens such as *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*), have led to the introgression of several resistance genes; therefore, molecular markers have become important in molecular-assisted selection (MAS) of tomato varieties resistant to those pathogens. However, assays that allow simultaneous evaluation of resistant genotypes, such as multiplex PCR, need to be optimized and evaluated to demonstrate their analytical performance, as many factors can affect them. This work aimed to generate multiplex PCR protocols for the joint detection of the molecular markers associated with pathogen resistance genes in tomato plants that are sensitive, specific and repeatable. For the optimization a central composite design of a response surface methodology (RSM-CCD) was used. For analytical performance evaluation, specificity/selectivity and sensibility (limit of detection and dynamic range) were analyzed. Two protocols were optimized: the first one with a desirability of 1.00, contained two markers (At-2 and P7-43) linked to *I-1* and *I-3*-resistant genes. The second one with a desirability of 0.99, contained markers (SSR-67, SW5 and P6-25) linked to *I-1*, *Sw-5*, and *Ty-3*-resistant genes. For protocol 1, all the commercial hybrids (7/7) were resistant to *Fol*, and for protocol 2, two hybrids were resistant to *Fol*, one to TSWV and one to TYLCV with good analytical performance. In both protocols, the varieties considered susceptible to the pathogens, no-amplicon or susceptible amplicons, were observed. The optimized multiplex PCR protocols showed dynamic ranges from 5.97 up to 161.3 ng DNA. The limit of detection was 17.92 ng and 53.76 ng DNA for protocols 1 and 2, respectively, giving 100% positive results in the test replicates. This method allowed to develop optimized multiplex PCR protocols with few assays which translates into less time and resources, without sacrificing method performance.

Keywords: tomato; molecular markers; resistance genes; protocols; multiplex PCR

1. Introduction

Tomato is common worldwide and has become an economically important crop due to the benefits of its fruit (a red berry of variable shape and size), rich in carotenoids, flavonoids, and vitamins; hence, it is sold and consumed both fresh and processed [1]. In Mexico, tomato is one of the main vegetables for export and domestic consumption. It is grown in most of the northwestern and western states of the country. In 2020, Mexico produced 3,441,639 tons of tomato, ranking ninth in worldwide production [2]. However, multiple fungal and viral pathogens such as TYLCV, TSWV and *Fol* affected its production, causing diseases that reduce yields, fruit quality and nutritional content. In extreme cases,

these diseases have forced growers to abandon production altogether [3–6]. Treatments of these diseases have mainly been chemical. However, high dependence on pesticides presents health risks to farmers, their families, and consumers. Furthermore, it negatively affects the environment, and substantially increases production costs, which increases financial risks for farmers and leads to higher costs for consumers [7].

To achieve sustainable agriculture and obtain high-quality products in terms of food safety, the use of resistant varieties has been implemented as a high-impact tool to reduce the damage caused by pathogens [8,9]. This can be achieved by genetic improvement through molecular markers, which allow the detection and identification of genes of interest in plants at early developmental stages, taking less time than conventional morphological markers. Moreover, it is not affected by epigenetic changes such as DNA methylation, histone modification and microRNAs [10]. Different types of techniques are used to detect molecular markers and allow the analysis of variation in the DNA molecule; restriction, and different types of Polymerase Chain Reaction (PCR) are some of them, with multiplex PCR being one of the most frequently used to identify molecular markers by using primer sets within a single PCR mix to produce amplicons of different sizes. This variant of PCR targets multiple markers or genes at once in a single test that would otherwise require several times the reagents and more time to run [11,12].

The endpoint multiplex PCRs provide a relatively easy, fast, and reliable method for the ensemble detection of molecular markers that serve as “signs” or “flags” of target genes, reducing the workload and costs of marker-assisted selection. The amplicons are visualized by gel electrophoresis in the case of endpoint multiplex PCR, which is different in real-time multiplex PCR where intercalating dyes such as EVA Green and SYBR Green I are used [13,14]. However, the success of these procedures is highly dependent on the concentration of the components and the reaction conditions. This work aimed to generate optimal, validated, and implementable protocols for the joint detection of molecular markers associated with pathogen resistance genes in tomato plants that are specific, sensitive, and reproducible. The development of these protocols may be useful for better selection of resistant materials by growers. In addition, the optimized protocols could be used in future genetic selection procedures of tomato lines for the genetic improvement of the species.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Varieties

Ten tomato varieties were tested, where seven of them were commercial hybrids with declared resistance by the suppliers to pathogens such as TYLCV, TSWV and *Fol* races 1, 2 and 3; and three tomato varieties kindly provided by the Agronomy Faculty of UAS (Table 1). The seeds were grown under greenhouse conditions (daytime temperatures of 21 °C to 27 °C, and night-time temperatures of 16 °C to 18 °C). Three to four weeks after planting, young leaves were sampled by taking at least three replicates of each material, transported on ice, and stored at 80 °C until DNA extraction.

2.2. DNA Extraction

DNA was extracted from approximately 200 mg of young leaves ground in liquid nitrogen using a slightly modified 2.5% Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) method [15]. The integrity of the Genomic DNA was assessed by running a 0.8% agarose gel in Tris-Acetate-EDTA (TAE), then stained with ethidium bromide and visualized under UV light with an Axygen system (Corning, Axygen® CTR, Mexico). DNA concentration and purity was measured using a QIAxpert system (Qiagen) considering 260/280 nm ratios around 1.8 as accepted DNA, and ratios lower than this value as proteins and phenol contamination.

Table 1. Commercial and non-commercial tomato materials used in this study.

Companies	Hybrids	Declared Resistance by Suppliers	Purposes
Hatear	Álvaro	HR: <i>Fol</i> (1,2); Vd; ToMV IR: TSWV; TYLCV; Mi; Mj; ToTV	Validation (protocol 1)
Hazera	Vanessa	HR: <i>Fol</i> (1,2,3) TSWV; Pst; ToANV IR: TYLCV	Optimization (protocol 2) and validation (protocols 1 and 2)
Seminis	SV8579TE	HR: <i>Fol</i> (0,2); Va; Vd; ToMV IR: TYLCV; Mi	Validation (protocol 1)
Seminis	SV3543TE	R: <i>Fol</i> (1,2,3); Tmv; TYLCV: ToTV; TYTV	Validation (protocol 1)
Seminis	SVTE8444	IR: <i>Fol</i> (1,2,3); TYLCV; Ma; Mi; Mj; Vd	Optimization (protocol 1) and validation (protocols 1 and 2)
Sakata	Valerio	IR: <i>Fol</i> (1,2,3); TYLCV; ToMV; Vd R: Aal	Validation (protocol 1 and 2)
No information	DRD600	<i>Fol</i> (1)	Validation (protocol 1)
No information	D-74	HR: <i>Fol</i> (1,3); TYLCV	Optimization (protocol 2) and validation (protocols 1 and 2)
Victory Seeds	Bonny Best	SC: <i>Fol</i> (1, 3); TYLCV	Validation (protocols 1 and 2)
Eden Seeds	Walter	IR: <i>Fol</i> (1) (IR)	Validation (protocols 1)

R: resistance; IR: intermediate resistance; HR: high resistance; SC: susceptible; *Fol*: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*; ToMV: *Tomato mosaic virus*; TSWV: *Tomato Spotted wilt virus*; TYLCV: *Tomato yellow leaf curl virus*; ToANV: *Tomato apex necrosis virus*; Pst: *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*; Ma; *Meloidogyne arenaria*; Mi: *Meloidogyne incognita*; Mj: *Meloidogyne incognita*; ToTV: *Tomato torrado virus*; Tmv: *Tobacco mosaic virus*; Aal: *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*; TYTV: *Tomato yellow top virus*; Va: *Vesicular-arbuscular*; Vd: *Verticillium dahliae*.

2.3. Molecular Markers Selection Criteria

One simple sequence repeat (SSR) and four sequence characterized amplified region (SCAR) markers were used as candidates for the multiplex PCR assay, testing two tomato viruses and one fungus resistance locus (Table 2). For the multiplex assay, PCR markers were chosen considering their diagnostic capacity, simple band patterns, clear size differences between the bands (avoiding similar-in-size amplicons for one given PCR protocol), and their capacity to indicate susceptibility and resistance alleles. The multiple primer analyzer program of ThermoFisher Scientific was used for the detection of possible primer dimer formation during the multiplex PCR.

Table 2. Gene locus, primers, molecular marker type, annealing temperature, amplicon base pair and references for the *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* molecular markers associated with the resistance genes used in the present study.

Genes	Markers	Types	Chr.	Primer sequences		Ta (°C)	Amplicons (bp)	References
				Forward	Reverse			
I	A1-2	SCAR	11	cgaatctgtatattacatccgcgt	ggggaataccggaatagtcgag	54	130 R	Avens et al. [16]
I-3	P7-43	SCAR	7	caacgggatatgttrttgataagcaatg	gcttttaccacaggaactttatacacc	53	875 R/650 S	Barillas et al. [17]
I	SSR-67	SSR	11	gcacgagaccagcagatla	ggggccttctccagtagac	–	900 R	Parmar et al. [18]
Sw5	SW-5	SCAR	9	aattagggtcttgaagcccatct	tccgcatacagcaatagbgt	54	375 R/464 S	Dianese et al. [19]
Ty-3	P6-25	SCAR	6	ggtagtgggaatgatgctc	gctctgcctatgtcccatatataacc	53	660 R/320 S	Ji et al. [20]

Chr: chromosome; Ta: annealing temperature; R: resistant; S: susceptible; Bp: base pair

2.4. Central Composite Design and Optimization

The protocols were optimized using DNA of three tomato genotypes (SVTE8444 for protocol 1, and a mixture of Vanessa and D-74 as template for protocol 2) carrying different combinations of *Fol*, TYLCV and TSWV resistance gene alleles in homozygous and heterozygous states. For the optimization of the multiplex PCR, the effects of the four independent factors (temperature of annealing (Ta), DNA amount, MgCl₂, and primer

concentrations) were investigated using a response surface methodology (RSM) (Table 3). The central composite design (CCD) for RSM required five levels, coded as $-2, -1, 0, 1, 2$. The total number of trials was 30, based on the five levels and a four-factor experimental design, with six replicates at the central conditions of the design for estimation of a pure error sum of squares (Supplementary Table S1). The levels for T_a were defined using a central condition for the annealing temperatures reported in previous studies where these markers have already been used, although the DNA amount, $MgCl_2$, and primer concentrations of centrals and axial points were calculated based on the recommended PCR kit specifications. Multiplex PCR reactions were performed in a thermal cycler (Bio-Rad) using the GoTaq PCR Core Systems in a final volume of 25 μ L reaction containing 1X GoTaq reaction buffer, 0.6 mM dNTPs and 1 U *Taq* polymerase. The dependent variable was the absolute difference of fluorescence intensity between the amplicons measured as pixels (denoted as Adj. Vol. in the software Image Lab (Bio-Rad)), considering that we looked for conditions where the reactions showed the greatest similarity in the intensity of the amplifications which indicates similarity in the opportunity of the primers to align. Considering significant differences at $p < 0.05$, a full quadratic regression model was estimated, and the statistical significance and goodness of fit was evaluated by analysis of variance (ANOVA) and R-squared (R^2). Optimization was computed using a response optimal analysis (contour plots and the desirability function) and verified using SVTE8444 (protocol 1), D-74, and Vanessa (protocol 2) hybrids' DNA. All collected data were analyzed using the statistical package MINITAB 18.1.

Table 3. Coded variables resulting from the experimental design for endpoint Multiplex-PCR optimization.

Variables	Axial (-2)	Factorial (-1)	Central (0)	Factorial (1)	Axial (2)
T_a ($^{\circ}C$)	50	52	54	56	58
DNA (ng)	10	30	50	70	90
$MgCl_2$ (mM)	1.5	2	2.5	3	3.5
Primer (μ M)	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9

T_a : annealing temperature.

2.5. Multiplex PCR Conditions

For all markers' amplification, the following conditions were used: denaturation, 4 min at 94 $^{\circ}C$; 34 cycles consisting of 30 s at 94 $^{\circ}C$, 60 s at T_a shown in Table 3, and 60 s at 72 $^{\circ}C$; and final extension of 10 min at 72 $^{\circ}C$.

2.6. Dynamic Range and Limit of Detection

The limit of detection is the minimum concentration at which a positive sample yields positive results at least 95% of the time. The dynamic range is the interval within which the analyte (amplicons) is detectable [21]. To determine the dynamic range of the markers in both protocols of multiplex PCR, serial dilutions of DNA from the same hybrids used in each optimized protocol were performed in a 1:3 ratio starting from 483.9 ng until 1.99 ng. The limit of detection was determined by testing five replicates with the lowest DNA amount in which the markers amplified, with at least 90% positive replicates. For each reaction, 1 μ L of DNA was added in a final volume of 25 μ L under the conditions previously described. multiplex PCR products were size-separated on a 1% agarose gel in 1 \times TAE buffer at 70 V, stained with ethidium bromide and visualized under UV light with the Axygen system (Corning, Axygen[®] CTR, Culiacan, Sinaloa, Mexico).

2.7. Specificity/Selectivity

To evaluate specificity/selectivity, detection of molecular marker sequences was performed using genomic DNA from all commercial and non-commercial tomato varieties (Table 1) using the optimized multiplex PCR protocols.

3. Results

3.1. Optimization of the Multiplex PCRs Conditions

The multiplex PCR runs, with primer pair mixing, was able to identify the specific region associated with resistance expression, without competition or inhibition between primers. For the At-2 marker of the *I* gene and P7-43 marker of the *I*-3 gene, resistant alleles (130 bp) and heterozygous-resistant alleles (875/650 bp) were observed in most of the runs using SVTE8444 as a template (Figure 1A). In the case of the SSR-67 marker of the *I* gene, the SW-5 marker of *Sw*-5 gene and P6-25 marker of *Ty*-3 gene resistant allele (900 bp), heterozygous-resistant alleles (574/464 bp) and heterozygous-resistant alleles (660/320 bp) were observed in most of the runs, respectively, using a mixture of Vanessa and D-74 as a template (Figure 1B).

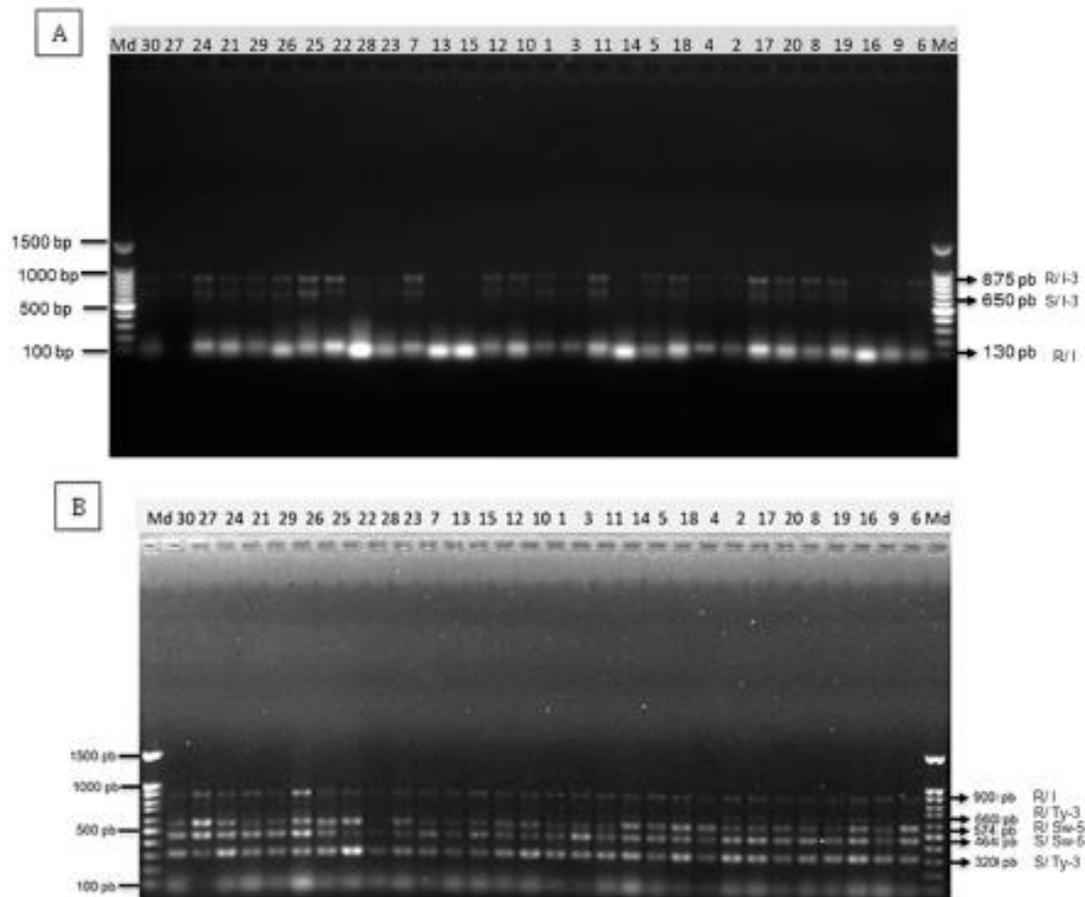


Figure 1. A 1% agarose gel electrophoresis of the amplifications (A) At-2 and P7-43; (B) SSR-67, Sw-5 and P6-25 markers. Md: 100 bp molecular weight marker. Number 1–30: Standard order of the runs (optimization).

Statistical analysis of the tested factors showed that the square of annealing temperature and the interaction between the primers' concentration and annealing temperature were significant, indicating stronger effects over fluorescence intensity for At-2 and P7-43 markers (Figure 2A, Table 4). For markers SSR-67, SW5 and P6-25 the square of annealing temperature was the only significant factor (Figure 2B, Table 4).

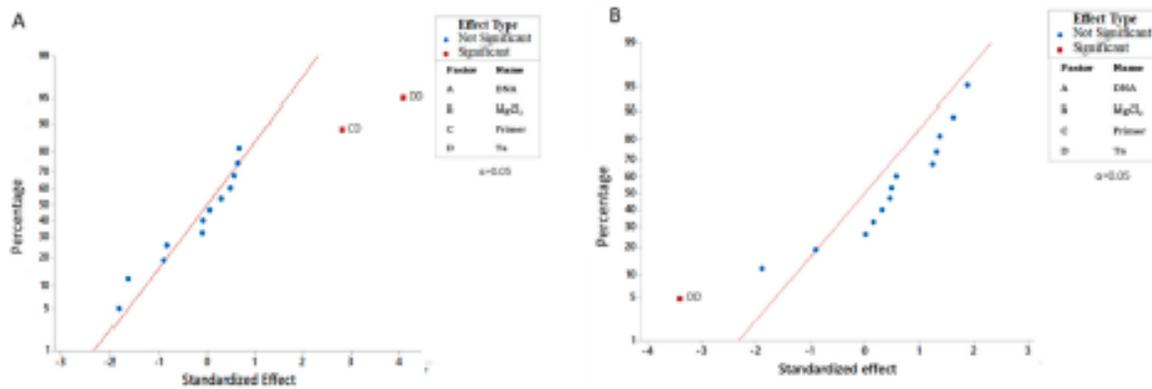


Figure 2. Statistically significant and not significant differences between concentrations of each factor and their interaction, normal plot of the standardized factors and interaction effects on the response variable (fluorescence intensity of the PCR products). (A) Multiplex PCR of At-2, and P7-43, molecular markers; (B) multiplex PCR of SSR-67, Sw-5 and P6-25 molecular markers.

Table 4. Analysis of variance (ANOVA) for the fluorescence intensity values for molecular markers using RSM-CCD.

Source	DF	AT-2; P7-43				SSR-67; SW5; P6-25			
		Seq SS	% Cont.	F	p	Seq SS	% Cont.	F	p
Model	15	53557084617	73.21	2.55	0.044 *	6.297×10^{13}	73.62	2.60	0.041 *
Blocks	1	857170949	1.17	0.61	0.447	1.463×10^{13}	17.10	9.07	0.009 *
Linear	4	1463078506	2.00	0.26	0.898	7.391×10^{12}	8.64	1.15	0.375
A	1	612566451	0.84	0.44	0.519	4.198×10^{12}	4.91	2.60	0.129
B	1	111438211	0.15	0.08	0.782	22124160	0.00	0.00	0.997
C	1	428883822	0.59	0.31	0.589	3.785×10^{11}	0.44	0.23	0.635
D	1	310190021	0.42	0.22	0.645	2.815×10^{12}	3.29	1.75	0.208
Square	4	38452271841	52.56	6.87	0.003 *	3.314×10^{13}	38.74	5.14	0.009 *
A × A	1	1242705553	1.70	0.73	0.406	1.013×10^{13}	11.84	3.51	0.082
B × B	1	6742079470	9.22	3.43	0.085	1.109×10^{12}	1.30	0.02	0.881
C × C	1	7173212681	9.81	2.75	0.120	3.261×10^{12}	3.81	3.59	0.079
D × D	1	23294274137	31.84	16.64	0.001 *	1.864×10^{13}	21.79	11.56	0.004 *
2-way int.	6	12784563320	17.48	1.52	0.242	7.816×10^{12}	9.14	0.81	0.580
A × B	1	11760784	0.02	0.01	0.928	1.331×10^{12}	1.56	0.83	0.379
A × C	1	18012102	0.02	0.01	0.911	3.289×10^{11}	0.38	0.20	0.658
A × D	1	1186384543	1.62	0.85	0.373	1.528×10^{11}	0.18	0.09	0.763
B × C	1	2876642	0.00	0.00	0.964	3.006×10^{12}	3.51	1.86	0.194
B × D	1	553783263	0.76	0.40	0.539	5.399×10^{11}	0.63	0.33	0.572
C × D	1	11011745986	15.05	7.87	0.014 *	2.458×10^{12}	2.87	1.52	0.237
Error	14	19595818329	26.79			2.257×10^{13}	26.38		
Lack of fit	10	11800089736	16.13	0.61	0.763	1.771×10^{13}	20.70	1.46	0.382
Pure error	4	7795728593	10.66			4.858×10^{12}	5.68		
Total	29	73152902946	100.00			8.554×10^{13}	100.00		

DF, degree of freedom; Seq SS, sequential sums of squares; % Cont., % of contribution; F, F-value; A, DNA; B, MgCl₂; C, primers; D, temperature of annealing; 2-way int., 2-way interactions. *, indicates significant differences.

Since only one of the interactions in the first protocols was significant, near-optimal settings for both protocols were calculated, choosing the trial in which a minimum difference in fluorescence intensity between the amplicons was obtained to favor the amplification of all amplicons. For markers At-2 and P7-43: Ta = 54 °C, 30.5 ng of DNA, 2.02 mM MgCl₂ and 0.5 μM primers with desirability of 1.00 (Figure 3A). For markers SSR-67, SW5 and P6-25: Ta = 55.88 °C, 71 ng of DNA, 2.00 mM MgCl₂ and 0.31 μM primers with desirability

of 0.99 (Figure 3B). With amplification of all the expected fragments, we did not observe any lack of specificity when validating the optimized multiplex PCRs.

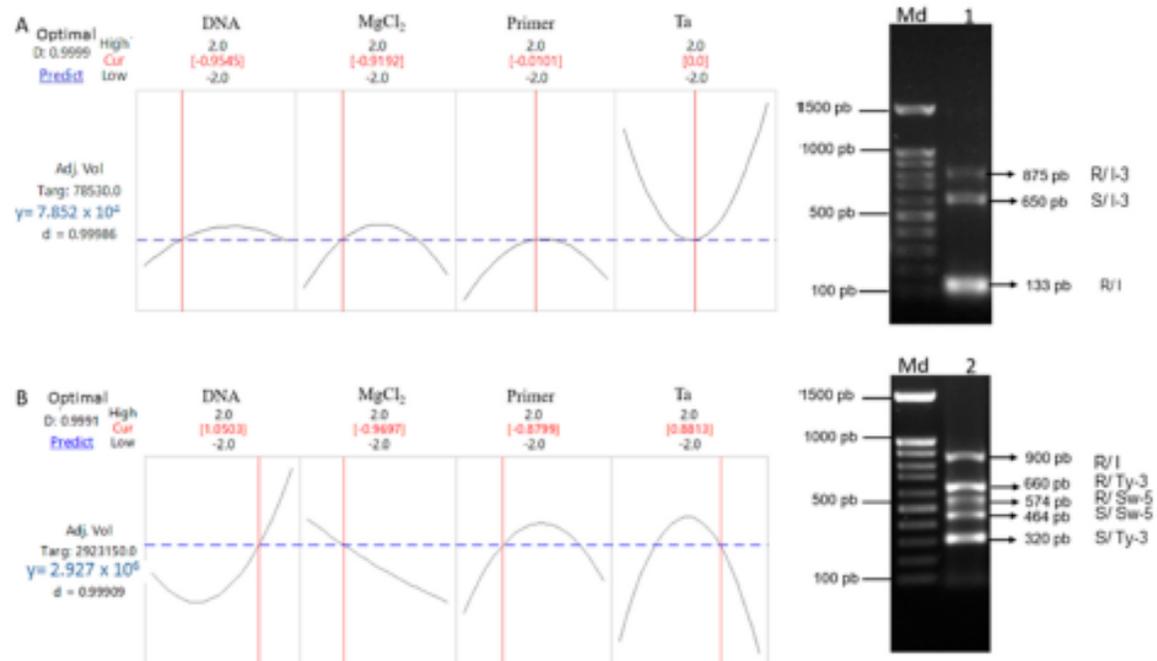


Figure 3. Desirability function plots of optimized PCR for molecular markers (A) At-2, and P7-43, (B) SSR-67, Sw-5 and P6-25. Md, 100 bp molecular weight marker. R indicates resistant genotype and S indicates susceptible genotype. The 1 indicates protocol 1 and 2 indicates protocol 2.

3.2. Dynamic Range, Limit of Detection and Specificity/Selectivity

For protocol 1, in all the commercial hybrids (7/7) considered resistant to *Fol* 1 and *Fol* 3, amplification of resistant alleles was observed. The tomato variety Bonny Best as expected did not present any marker associated with the resistance genes (Figure 4A).

For protocol 2, hybrids SV8444TE and D-74 showed resistance patterns to *Fol* by amplifying the 900 pb representative of the SSR-67 marker which served to discriminate the resistant/tolerant cultivar with an allele size of 900 pb in comparison to the susceptible one with no amplicon. The commercial hybrid Vanessa was the only tomato variety which showed the resistance allele of a SW-5 marker. The hybrid D-74 also showed a resistance allele of 660 pb of a P6-25 molecular marker, and all the other varieties only showed a susceptible allele of 320 pb. The variety Bonny best and the commercial hybrid Valerio amplified the susceptible alleles of SW-5 and P6-25 and no amplicon for SSR-67, which was expected from the Bonny Best but not Valerio (Figure 4B). The optimized PCR protocols showed dynamic ranges from 5.97 ng up to 161.3 ng DNA (Figure 4C,D). The limit of detection was 17.92 ng and 53.76 ng DNA for protocols 1 and 2, respectively, giving 100% positive results in the test replicates (Figure 4E,F).

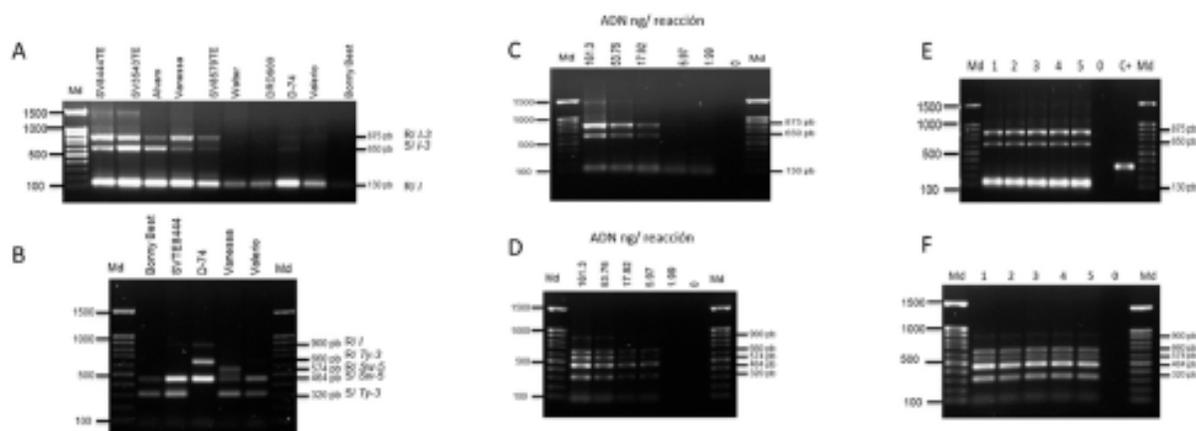


Figure 4. Evaluation of dynamic range and specificity/selectivity of optimized PCR protocols. Specificity/selectivity: (A,B); dynamic range: (C,D); limit of detection: (E,F). Md, 100 bp molecular weight marker. R indicates resistant genotype and S indicates susceptible genotype. C+, positive process control (plasmid DNA).

4. Discussion

Without resorting to statistical methods, to optimize a PCR often requires testing a large number of reaction conditions. In the case of multiplex PCR, establishing conditions that allow amplification of multiple molecular markers using primer mixtures requires proportionally more effort and a larger number of reactions. Multiplex PCRs require that primers lead to amplification of single regions of DNA, either in single pairs or in combinations of many primers, under a single set of reaction conditions. Although there is no clear theoretical limit to the number of sequences that can be amplified simultaneously, restrictions in setting conditions for specific and interpretable reactions often limit the useful number of target sequences [22]. Using a response surface methodology reduces the number of reactions, because the program algorithm provides a minimum number of runs considering the most important combinations.

Multiplex PCR can detect a greater total concentration of amplification products than is obtained with a simplex PCR. However, the efficient detection of specific amplicons is greatly influenced by intrinsic parameters related to a Multiplex PCR reaction mixture and amplification conditions, such as the rate at which amplified fragments anneal with each other rather than the primers, reagents concentration, number of cycles, temperature of annealing, among others, which affect Multiplex PCR performance, including reproducibility, sensitivity, and specificity of the technique [22]. In this study, we performed optimization of Multiplex PCR parameters through RSM using a CCD design to model experimental data and found the critical factors that optimized the response variable, in this case, fluorescence intensity of multiplex PCR products. One of the keys to successful multiplex PCRs of any type lies in the design of appropriate primers, even more so in the case of a multiplex PCR. The primer concentration is a critical parameter for a successful multiplex reaction [23]. Ideally, all the primers should enable identical amplification efficiencies for each amplicon. While it is difficult to predict the efficiency that any given primer pair will display, primers with nearly identical optimum annealing temperatures should work under fairly similar conditions if they anneal with single copy sequences. If all the primers in a reaction anneal with equal efficiencies, they can generally be used at the same concentration [21]. Another key parameter for successful multiplex PCRs is the annealing temperature. The optimal T_a directly depends on the composition (GC content) and length of primers and is usually used 5 °C below the melting temperature of primers. Therefore, interactions between the primer and T_a usually affect multiplex PCRs [24].

The primers of the At-2 marker (protocol 1) were designed to amplify a 130 bp band only in resistance strains, since the reverse primer matches with an additional 7 bp present only in resistant varieties and the forward primer matches with a common region in resistant and susceptible varieties [16]. PCR products of 875 bp for resistant and 650 bp for susceptible varieties were reported by Barillas et al. [17] for the P7-43 marker (protocol 1), when they tested the commercial hybrids, Plum Crimson, Amelia, Crista, Solar Fire and three experimental hybrids resistant to *Fol* race 3 (I-3/i-3). In our study, all the commercial hybrids considered resistant to *Fol* analyzed with these molecular markers showed the same resistant alleles. These results demonstrate the good performance of the optimized protocol; in this case, its specificity. Cultivars containing, I-3 have been successfully used for the control of *Fol* 3 for over more than 30 years, but this resistance has not been as ubiquitously deployed as the I or I-2 genes, and therefore, selection pressure for mutation in the pathogen has not been as intense [25]. The validation of a multiplex PCR protocol containing a molecular marker linked to this resistance gene will lead to the increased use of this gene.

SSR-67 (protocol 2) was found to be a putative marker for resistant tomato cultivars and could discriminate between tolerant/resistant cultivars with an allele of 900 bp and no amplicon in susceptible cultivars [18]. For the SW-5 marker (protocol 2), homozygous-resistant, susceptible, and heterozygous-resistant tomato genotypes presented the same band size when analyzed by Kabaş et al. [26] using 40 tomato hybrids. Allele variants of this SCAR codominant marker (SW5) associated with resistance or susceptibility to TSWV are known to have specific sizes [26,27]. The P6-25 marker (protocol 2) based on locus *Ty-3* of the tomato genome is known to be associated with tomato resistance to TYLCV. Tomato hybrids resistant to TYLCV from different commercial seed companies analyzed with the P6-25 marker presented two alleles (660/320 bp) for heterozygous-resistant genotypes [20,28–30]. This marker has been widely used for selecting resistant tomato lines [31,32], suggesting that the target region is highly conserved and linked to *Ty-3* mediated resistance. The resistant alleles shown in the considered resistant materials and susceptible alleles or no amplification when it is the case by these molecular markers in our study also demonstrate the specificity of this optimized protocol.

Pyramiding multiple resistance genes against pathogens such as *Fol*, TYLCV and TSWV is difficult to achieve by classical breeding. Breeders using MAS can combine multiple resistance genes against them which is likely to extend resistance against multiple fungal and viral strains. The lack of markers in some of the commercial hybrids could probably have been due to the existence of polymorphisms on the target region that likely affected recognition sites of primers [33], suggesting that specificity/selectivity of molecular markers is highly dependent on genetic diversity of the analyzed varieties. Dominant molecular markers such as At-2 and SSR-67 make it difficult to evaluate genotypes as susceptible homozygous and the respective heterozygous in plants. We recommend the use of codominant SCAR molecular markers and tomato materials that allow to evaluate the resistant homozygous, susceptible homozygous and heterozygous, which was one of our limitations during this investigation.

5. Conclusions

The optimization of these two protocols using RSM CCD represents an advantageous method for joint detection of these molecular markers with good analytical performance using few combinations of the variables that influence multiplex PCR. The present study detected five commonly used molecular markers of tomato linked to resistant genes against economically important diseases in the time and with the reagents (except primers) of two tests, thereby reducing reaction costs and workload. The optimized and validated protocols may be used to identify resistant genotypes for future breeding programs.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/genes14020337/s1>, Table S1: Central composite design runs for the multiplex PCR.

Author Contributions: Conceptualization, J.B.V.-T., R.S.G.-E., M.J.E.-A. and J.L.-E.; Data curation, R.L., C.V. and J.L.-E.; Formal analysis, R.L., J.B.V.-T., R.S.G.-E., M.J.E.-A. and J.L.-E.; Funding acquisition, R.S.G.-E. and J.L.-E.; Investigation, R.L. and J.L.-E.; Methodology, R.L., J.B.V.-T. and J.L.-E.; Project administration, J.L.-E.; Resources, R.S.G.-E. and J.L.-E.; Supervision, J.B.V.-T., C.V., R.S.G.-E., M.J.E.-A. and J.L.-E.; Validation, J.B.V.-T., C.V. and J.L.-E.; Writing—original draft, R.L. and J.L.-E.; Writing—review & editing, J.B.V.-T., C.V., R.S.G.-E., M.J.E.-A. and J.L.-E. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Culiacán, grant number 2018110477.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors are grateful to Juan Lopez Santiago for providing infrastructure and technical support for the development of this research.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

- Bergougnoux, V. The history of tomato: From domestication to biopharming. *Biotechnol. Adv.* **2014**, *32*, 170–189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- SIAP. Available online: https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2020/Atlas-Agroalimentario-2020 (accessed on 20 October 2022).
- Asencio-Álvarez, A.; López-Benitez, A.; Borrego-Escalante, E.; Rodríguez-Herrera, S.; Flores-Olivas, A.; Jiménez-Díaz, E.; Gámez-Vázquez, A. Marchitez Vascular del Tomate: I. Presencia de Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen en Culiacán, Sinaloa, México. *Rev. Mex. Fitopatol.* **2008**, *26*, 114–120.
- Al Abdallah, A.M.; Al Debei, H.S.; Asmar, H.; Misbeh, S.; Quraan, A.; Kvamheden, A. An efficient in vitro-inoculation method for Tomato yellow leaf curl virus. *Virology* **2010**, *7*, 84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lugo-Melchor, O.Y.; Guzmán-Urriarte, R.; García-Estrada, R.S.; León-Félix, J.; Josefina, L.F. Geminivirus Transmitidos por Mosca Blanca (*Bemisia Tabaci*) en Tomate, en el Valle Agrícola de Culiacán, Sinaloa. *Rev. Mex. Fitopatol.* **2011**, *29*, 109–118.
- FAOSTAT. Available online: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize> (accessed on 20 October 2022).
- Hanson, P.; Lu, S.-E.; Wang, J.-E.; Chen, W.; Kenyon, L.; Tan, C.-W.; Tee, K.L.; Wang, Y.-Y.; Hsu, Y.-C.; Schafleitner, R.; et al. Conventional and molecular marker-assisted selection and pyramiding of genes for multiple disease resistance in tomato. *Sci. Hort.* **2016**, *201*, 346–354. [[CrossRef](#)]
- Sánchez-Peña, P.; Oyama, K.; Núnéz-Farfán, J.; Fornoni, J.; Hernández-Verdugo, S.; Márquez-Guzmán, J.; Garzón-Tiznado, J.A. Sources of resistance to whitefly (*Bemisia* spp.) in wild populations of *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* (Dunal) Spooner G. J. Anderson et R. K. Jansen in Northwestern Mexico. *Genet. Resour. Crop Evol.* **2006**, *53*, 711–719. [[CrossRef](#)]
- Flores-Hernández, L.A.; Lobato-Ortiz, R.; García-Zavala, J.J.; Molina-Galán, J.D.; Sargerman-Jarquín, D.M.; Velasco-Alvarado, M.d.J. Parentes silvestres del tomate como fuente de germoplasma para el mejoramiento genético de la especie. *Rev. Fitotec. Mex.* **2017**, *40*, 83–91. [[CrossRef](#)]
- Arruabarrena, A.; González, A.M.; Rubio, L.; Giménez, G. Selección Asistida por Marcadores en el mejoramiento genético de tomate. *Biotecnología para el sector productivo. INIA* **2015**, *40*, 43–46.
- Velázquez-Alejos, L.P.; Aragón Martínez M del, C.; Amelia Cornejo, R. Extracción y purificación de ADN. *Hortum. Mol. Apl. Ecol. Asp. Teóricos Prácticos* **2010**, *1*, 1–26.
- Ebert, A.W.; Chou, Y.Y. The tomato collection maintained by AVRDC—The World Vegetable center: Composition, germplasm dissemination and use in breeding. *Acta Hort.* **2015**, *1101*, 169–176. [[CrossRef](#)]
- Dias, V.D.; Oliveira, R.M.D.; Dianese, Ê.D.C.; Boiteux, L.S.; Cunha, M.G.D. Detecção simultânea de fatores de resistência à murcha de fusário do tomateiro por meio de PCR multiplex. *Pesqui. Agropecuária Bras.* **2016**, *51*, 925–932. [[CrossRef](#)]
- Chen, H.-M.; Lin, C.-Y.; Yoshida, M.; Hanson, P.; Schafleitner, R. Multiplex PCR for Detection of Tomato Yellow Leaf Curl Disease and Root-Knot Nematode Resistance Genes in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Int. J. Plant Breed. Genet.* **2015**, *9*, 44–56. [[CrossRef](#)]
- Doyle, J.J.; Doyle, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *FOCUS* **1990**, *12*, 39–40.

16. Arens, E.; Mansilla, C.; Deinum, D.; Cavellini, L.; Moretti, A.; Rolland, S.; van der Schoot, H.; Calvache, D.; Porz, E.; Collonnier, C.; et al. Development and evaluation of robust molecular markers linked to disease resistance in tomato for distinctness, uniformity and stability testing. *Theor. Appl. Genet.* **2010**, *120*, 655–664. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Barillas, A.C.; Mejia, L.; Sánchez-Pérez, A.; Maxwell, D.P. CAPS and SCAR markers for detection of I-3 gene introgression for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3. *Rep. Tomato Genet. Coop.* **2008**, *58*, 11–17.
18. Parmar, P.P.; Bhatt, K.N.; Oza, V.P.; Patel, A.D.; Kathiria, K.B.; Subramanian, R.B. Microsatellite marker associated with Fusarium wilt resistance in tomato. *World J. Agric. Sci.* **2009**, *5*, 389–393.
19. Dianese, E.C.; de Fonseca, M.E.; Kormelink, R.G.; Inoue-Nagata, A.K.; Resende, R.O.; Boiteux, L.S. Development of a locus-specific, co-dominant SCAR marker for assisted-selection of the Sw-5 (Tospovirus resistance) gene cluster in a wide range of tomato accessions. *Mol. Breed.* **2010**, *25*, 133–142. [\[CrossRef\]](#)
20. Ji, Y.; Schuster, D.J.; Scott, J.W. Ty-3, a begomovirus resistance locus near the Tomato yellow leaf curl virus resistance locus Ty-1 on chromosome 6 of tomato. *Mol. Breed.* **2007**, *20*, 271–284. [\[CrossRef\]](#)
21. ISO 16140: 2003; Microbiology of Food and Animal Feedstuffs—Protocol for the Validation of Alternative Methods. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2003.
22. Chamberlain, J.S.; Chamberlain, J.R. Optimization of multiplex PCRs. In *The Polymerase Chain Reaction*; Birkhäuser: Boston, MA, USA, 1994; pp. 38–46. [\[CrossRef\]](#)
23. Bolívar, A.M.; Rojas, A.; García-lugo, P. PCR y PCR-Múltiple parámetros críticos y protocolo de estandarización. *An. Biomed.* **2014**, *3*, 25–33.
24. Obradovich, J.; Jurisic, V.; Tosic, N.; Mrdjanovic, J.; Perin, B.; Pavlovic, S.; Djordjevic, N. Optimization of PCR conditions for amplification of GC-rich EGFR promoter sequence. *J. Clin. Lab. Anal.* **2013**, *27*, 487–493. [\[CrossRef\]](#)
25. Chitwood-Brown, J.; Vallad, G.E.; Lee, T.G.; Hutton, S.F. Breeding for Resistance to Fusarium Wilt of Tomato: A Review. *Genes* **2021**, *12*, 1673. [\[CrossRef\]](#)
26. Kabag, A.; Fidan, H.; Demirelli, M.B. Identification of new sources of resistance to resistance-breaking isolates of tomato spotted wilt virus. *Saudi J. Bot. Sci.* **2021**, *28*, 3094–3099. [\[CrossRef\]](#)
27. Panthee, D.R.; Ibrahim, R. New molecular markers associated with the Sw-5 gene conferring resistance to tomato spotted wilt virus in tomato. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* **2013**, *88*, 129–134. [\[CrossRef\]](#)
28. Nevame, A.Y.M.; Xia, L.; Nchongboh, C.G.; Hasan, M.M.; Alam, A.; Yongbo, L.; Wenting, Z.; Yafei, H.; Emon, R.M.; Ismail, M.R.; et al. Development of a new molecular marker for the resistance to tomato yellow leaf curl virus. *BioMed Res. Int.* **2018**, *2018*, 1–10. [\[CrossRef\]](#)
29. Nevame, A.; Xia, L.; Wenting, Z.; Nchongboh, C.G.; Wenhui, L.; Hasan, M.M.; Alam, A.; Longting, S. Validation of some disease-resistance molecular markers associated with multiple diseases in tomato for marker-assisted selection program. *Scientia 2020*, *4*, 19–29. [\[CrossRef\]](#)
30. Lafrance, R.; Villicaña, C.; Valdéz-Torres, J.B.; Martínez-Montoya, H.; Castillo-Ruiz, O.; Alemán-Castillo, S.E.; Esparza-Araiza, M.J.; León-Félix, J. Optimization of PCR-based TYLCV molecular markers by response surface methodology. *Gene* **2021**, *785*, 145606. [\[CrossRef\]](#)
31. Tabeiri, S.; Behjatnia, S.A.A.; Laviano, L.; Pecchioni, N.; Accotto, G.P.; Noris, E.; Micozzi, L. Pyramiding Ty-1/Ty-3 and Ty-2 in tomato hybrids dramatically inhibits symptom expression and accumulation of tomato yellow leaf curl disease inducing viruses. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* **2017**, *50*, 213–227. [\[CrossRef\]](#)
32. Mahfouze, S.A.; Mahfouze, H.A. A Comparison between CAPS and SCAR Markers in the Detection of Resistance Genes in some Tomato Genotypes against Tomato Yellow Leaf Curl Virus and Whitefly. *Jordan J. Bot. Sci.* **2019**, *12*, 123–133.
33. Nadeem, M.A.; Nawaz, M.A.; Shahid, M.Q.; Dogan, Y.; Comertpay, G.; Yildiz, M.; Hatipoglu, R.; Ahmad, F.; Alsaleh, A.; Labhane, N.; et al. DNA molecular markers in plant breeding: Current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2018**, *32*, 261–285. [\[CrossRef\]](#)

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

**3. SELECTION OF TOMATO (*Solanum lycopersicum*) HYBRIDS RESISTANT TO *Fol*,
TYLCV, TSWV, WITH EARLY MATURITY AND GOOD FRUIT QUALITY
DEVELOPED IN SINALOA**

Richecarde Lafrance¹, Claudia Villicaña², José Benigno Valdéz-Torres¹, Raymundo Saúl García Estrada¹, Manuel Alonzo Báez Sañudo¹, Mayra Janeth Esparza-Araiza³ and Josefina León-Félix^{1*},

¹ Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), A.C., Culiacán, Sinaloa 80110, México; rlafrance220@estudiantes.ciad.mx

² CONACYT-Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Culiacán, Sinaloa 80110, México; maria.villicana@ciad.mx

³ Centro de Innovación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria de Sinaloa- Fundación Produce Sinaloa, A.C. Aguaruto, Sinaloa 80308, México; mayjanes11@gmail.com

* Correspondence: ljosefina@ciad.mx.

Revista:

Horticulturae

Publicado el:

8 de agosto del 2024

DOI

<https://doi.org/10.3390/horticulturae10080839>



Article

Selection of Tomato (*Solanum lycopersicum*) Hybrids Resistant to Fol, TYLCV, and TSWV with Early Maturity and Good Fruit Quality

Richecarde Lafrance ¹, Claudia Villicaña ², José Benigno Valdéz-Torres ¹, Raymundo Saúl García-Estrada ¹, Manuel Alonzo Báez Sañudo ¹, Mayra Janeth Esparza-Araiza ³ and Josefina León-Félix ^{1,*}

¹ Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), A.C., Culiacán 80110, Sinaloa, Mexico; rlafrance220@estudiantes.ciad.mx (R.L.); jvaldez@ciad.mx (J.B.V.-T.); rsgarcia@ciad.mx (R.S.G.-E.); mabaez@ciad.mx (M.A.B.S.)

² CONAHCYT-Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), A.C., Culiacán 80110, Sinaloa, Mexico; maria.villicana@ciad.mx

³ Centro de Innovación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria de Sinaloa, Fundación Produce Sinaloa, A.C., Aguaruto, Culiacán 80308, Sinaloa, Mexico; mayjanes11@gmail.com

* Correspondence: ljoselina@ciad.mx

Abstract: Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is widely grown in the tropics, where its production is subjected to heavy disease losses. A goal of tomato breeders is genetic improvement of early maturity genotypes with higher fruit quality under challenging environmental conditions, such as the presence of multiple pathogens, is the goal of tomato breeders. In Mexico, tomato is one of the main exported vegetables, grown in most of the northwestern states of the country, with the state of Sinaloa as one of the largest producers. In this study, we evaluated fruit quality parameters in 16 tomato hybrids (14 hybrids under development in Sinaloa and 2 as commercial lines), which were previously analyzed with molecular markers to detect gene resistance. The hybrids were harvested at the “red ripe” stage at three different harvest dates. Total soluble solids (TSS), titratable acidity, pH, color, firmness, and the TSS/acidity ratio were evaluated. Of the 16 hybrids analyzed, 2 showed the presence of genes for resistance to TYLCV, 7 for resistance to TSWV and Fol race 3, 15 for resistance to Fol race 2, and all 16 for resistance to Fol race 1. Results show that most of the tomato hybrids analyzed during the three harvest dates met market standards reported in the USDA’s fresh tomato import regulations and Mexico Supreme Quality 2005 (MCS Mexico Calidad Suprema for its acronym in Spanish). However, two of the advanced developmental hybrids better met the market requirements and are also maturing early.

Keywords: tomato; early maturity; harvest quality



Citation: Lafrance, R.; Villicaña, C.; Valdéz-Torres, J.B.; García-Estrada, R.S.; Báez Sañudo, M.A.; Esparza-Araiza, M.J.; León-Félix, J. Selection of Tomato (*Solanum lycopersicum*) Hybrids Resistant to Fol, TYLCV, and TSWV with Early Maturity and Good Fruit Quality. *Horticulturae* **2024**, *10*, 839. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10080839>

Academic Editor: Sergio Ruffo Roberto

Received: 18 June 2024

Revised: 4 August 2024

Accepted: 6 August 2024

Published: 8 August 2024



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

1. Introduction

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is a diploid plant that belongs to the Solanaceae family, originated in South America, and its domestication occurred in Mexico. The Aztecs first cultivated it. Its name, “tomato”, from the Nahuatl language spoken in the region of Mexico, corresponds to *Physalis philadelphica*; the tomato itself, “jitomatl”, corresponds to *S. lycopersicum* [1]. Section *Lycopersicon* of the genus *Solanum* contains 13 subspecies: the cultivated tomato, *S. lycopersicum*, the only domesticated species, and 12 wild species [2]. During its domestication, the species *S. lycopersicum* lost much of the genetic diversity present in its wild ancestor [3]. Several factors probably contributed to this, such as migration out of the area of origin, gene selection and introgression to obtain a high number of fruits under self-fertilization, and genetic bottlenecks associated with domestication and crop improvement [4]. Crossing between the cultivated variety and wild species with the genetic traits of interest is necessary to recover these lost genes. However, the chances of

these favorable genetic combinations occurring by chance and the probability of identifying them without the use of molecular markers could be higher. Therefore, the use of molecular markers for both the selection of wild species and the development of new hybrids is of utmost importance.

Globally, there are both private and public germplasm banks with mandates to collect accessions (wild species and developed cultivars) of tomatoes with specific characteristics such as disease resistance, adaptation to agroecosystems, and regional agricultural systems for subsequent use in the genetic improvement of the cultivated species. Older landraces are also collected to conserve the countries' national biocultural heritage [5,6]. Germplasm characterization in Mexico is very scarce despite being the center of domestication and high germplasm production. Particularly in northwestern Mexico, there needs to be more material collections.

Tomato crop production and exporting to the United States are two main agricultural activities in Mexico. The United States is a country demanding a quality product, which represents a challenge for Mexican production companies [7]. The maturity date of tomato fruits is an essential factor in defining the price of these fruits in the market. Fruits of ultra-early and early maturing tomato varieties (60–75 days after sowing) with good quality characteristics tend to have higher prices because they are harvested on time when the product is scarce [8]. Tomatoes can only be stored for a short period, forcing producers to meet the demand for them with current production. This causes prices to increase when supply is scarce (winter months) and decrease when supply is abundant (summer months) [9,10]. In addition to seasonal trends, tomato prices can also be highly variable throughout the harvest season due to crop affectations by some pathogens, such as *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), *tomato spotted wilt virus* (TSWV), and *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (Fol) [11–13]. These variations in markets and their effects on grower incomes cause growers to seek pathogen-resistant tomato hybrids that produce early-maturity fruits with good quality.

All the parameters that define the quality of tomatoes are vital for their value in the market. According to [14], the external color is one of the essential characteristics of the quality of any product since the first thing consumers consider when buying a product is the visual aspect; in the case of tomato, for the consumer, the red color is an indicator of taste quality. For this reason, markets usually adopt measures to improve the external quality of the products, such as wax coating, excellent and innovative packaging, etc. Although these measures can be of great help in the first sales, the increase or decrease in subsequent sales depends on the internal quality of the fruit [15], such as internal color, pH, titratable acidity, total soluble solids (TSS), TSS/acidity ratio and pulp firmness [16]. In this research, we first evaluated the fruit quality of 16 tomato hybrids, 14 under development in Sinaloa, Mexico and 2 as commercial lines, which contained genes resistant to the above-mentioned pathogens using some PCR protocols optimized by [17]. We evaluated the quality of both external and internal factors (internal and external fruit colors, firmness, total soluble solids, pH, and titratable acidity) of tomato fruits at three maturity dates of harvest to select early ripening varieties that maintain acceptable fruit quality.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Materials and Resistant Genes Experiment

Seeds of 16 round tomato hybrids, 14 hybrids under development, and 2 commercial hybrids were used for the trials. Dr. Juan Lopez of Tricar company provided both the developing hybrids and the commercial hybrids in Sinaloa, Mexico. The seeds were sown in 128-cavity polypropylene trays for germination using peat moss as substrate. After that, the trays were covered with black plastic bags to protect the seeds from light during germination. Five days after sowing, the seeds were germinated. The seedlings were kept in the trays until they were sufficiently developed to be transplanted into the greenhouse. They were then grown under greenhouse conditions (daytime temperatures of 21 °C to

27 °C and nighttime temperatures of 16 °C to 18 °C) and irrigated as needed using coconut fiber as a growing medium.

Leaf samples were taken to identify resistance genes present in these hybrids, and optimized PCR protocols validated by [17] were used.

Fruits were harvested at 75, 105, and 140 days after sowing (March, April, and May 2022) and immediately transported to the experimental laboratory (quality laboratory of CIAD-Culiacán), presenting uniform characteristics in color (red stage maturity or color six according to “Color Classification Requirement in United States Standards for Grades of Fresh Tomatoes” chart, published by USDA) and size. Three fruits per hybrid were taken for each sampling date for quality analysis. External factors were evaluated on the same day, and parts of the samples were stored at −20 °C until all internal factors were assessed.

2.2. Harvest Quality Analysis

2.2.1. External and Internal Colors

The external color was measured on the surface or epidermis of the tomato fruit (2 longitudinal readings/sample). The fruits were split in half for the internal color, and the measurement was made on the fruit’s pulp (2 equatorial readings/sample). Three fruits were analyzed for each hybrid. The color of tomato fruits was determined using a Konica CM-700d spectrophotometer (Minolta Inc., Tokyo, Japan), recording the components of hue angle (h°) and chromaticity (chroma) with the program OnColor QC version 5. The chroma has values ranging from 0, corresponding to dark colors, to 100, representing light colors or those with greater luminosity. In the hue angle (h°), the values range from 0 to 360° representing the color of the fruit; for example, counterclockwise, red = 0°, yellow = 90°, green = 180°, blue = 270° and from purple to red in 360°. The chromaticity of the color ranges from 0 to 60, where low values represent impure colors (towards the center of the color circle), while high values represent pure or more intense colors. To interpret the value of the equipment in a^* and b^* coordinates, the following formulas were used to calculate the chromaticity.

$$\text{Chromaticity} = \sqrt{a^2 + b^2} \quad (1)$$

$$\text{hue angle } (h^\circ) = \tan^{-1} (b/a) \quad (2)$$

2.2.2. pH and Titratable Acidity

The determinations of pH and titratable acidity were carried out according to the methodology proposed by [16]. An extract was obtained by liquefying 10 g of the sample with 50 mL of distilled water previously neutralized to pH seven and filtered through an organza cloth. An aliquot of 50 mL of the extract was taken and titrated with a 0.1 N NaOH solution in a Mettler Toledo Model T-50 automatic titrator until a pH of 8.2 was reached, which indicates acid–base neutralization. The pH was expressed directly prior to titration as hydrogen ions were present in the sample. Three repetitions were made for each hybrid. The results of the titratable acidity were expressed as a percentage of citric acid present in the sample, according to the following formula:

$$\%A.T. = (\text{mL NaOH spent}) (N \text{ of NaOH}) (0.064) (100) / \text{mL of concentrate} \quad (3)$$

where 0.064 is the milliequivalent of citric acid.

2.2.3. Total Soluble Solids

All tomato fruits were harvested at a late stage of ripening (full red color) because the physiological maturity of the fruit at the time of harvest is a determinant of quality as TSS content. As for pH and acidity, the same extract was obtained by liquefying 10 g of the sample with 50 mL of distilled water, which had been previously neutralized to pH seven and filtered through an organza cloth. One to two drops of clear juice were placed on the prism of a Mettler Toledo RM-40 refractometer (Columbus, OH, USA) previously calibrated with distilled water with a range of 0 to 32 °Brix, a resolution of 0.2 °Brix, and a

compensated temperature. Between samples, the prism of the refractometer was washed with distilled water and dried before use. The results obtained were multiplied by the dilution factor (water and pulp) and expressed in °Brix. Three repetitions were made for each hybrid. The TSS/acidity ratio was calculated by dividing the TSS percentage by the acidity percentage.

2.2.4. Firmness

For the determination of firmness by puncture, a tetramer (Chatillon DFGS100, AMETEK Measurement and Calibration Technologies division, Somerset Drive Largo, FL, USA) was used, equipped with a round steel tip of 8 mm diameter, whose force to penetrate the fruit tissue was expressed in Newton (N). A 10 mm insertion was applied on the mesocarp side, using two sides of each tomato fruit (in equidistant zones). Three fruits and two readings per fruit were analyzed for each tomato hybrid.

2.3. Statistical Analysis

A two-factor, completely randomized design with one covariate, was used. The factors were 16 hybrids used in the study and three harvesting dates (75, 105, and 140 days after sowing). The covariate was five resistance genes (I, I-3, Sw-5, Ty-3, I-2). The response variables were total soluble solids (°Brix), firmness (N), internal and external colors (hue angle and chromaticity), pH, and titratable acidity. Three replications (fruits) were analyzed for each hybrid on each harvest date.

3. Results

3.1. Genes Detections

Of the 16 hybrids (14 in development and 2 commercial) analyzed, 2 showed the presence of genes for resistance to TYLCV, 7 for resistance to TSWV and Fol race 3, 15 for resistance to Fol race 2, and all 16 for resistance to Fol race 1 (Table 1).

Table 1. Commercial and non-commercial tomato materials were used in this study.

Codes	Tomato Hybrids	Resistance/Susceptibility
T-101	non-commercial	IR: Fol (1, 2); SC: Fol (3), TSWV; TYLCV
T-108	non-commercial	IR: Fol (1, 2); SC: Fol (3), TSWV; TYLCV
T-142	commercial	IR: Fol (1, 2, 3), TSWV; SC: TYLCV
T-140	commercial	IR: Fol (1) SC: Fol (2, 3), TYLCV, TSWV
T-117	non-commercial	IR: Fol (1, 2, 3); HR: TSWV; SC: TYLCV
T-118	non-commercial	IR: Fol (1, 2); SC: Fol (3), TSWV; TYLCV
T-128	non-commercial	IR: Fol (1, 2, 3), TSWV; SC: TYLCV
T-132	non-commercial	IR: Fol (1, 2, 3), TSWV; SC: TYLCV
T-58	non-commercial	IR: Fol (1, 2); SC: Fol (3), TSWV; HR: TYLCV
T-49	non-commercial	IR: Fol (1, 2, 3); HR: TSWV; SC: TYLCV
T-59	non-commercial	IR: Fol (1, 2, 3); HR: TSWV; SC: TYLCV
T-63	non-commercial	IR: Fol (1, 2); SC: Fol (3), TSWV; IR: TYLCV
T-57	non-commercial	IR: Fol (1, 2, 3), TSWV; SC: TYLCV
T-90	non-commercial	IR: Fol (1, 2); SC: Fol (3), TSWV; TYLCV
T-91	non-commercial	IR: Fol (1, 2); SC: Fol (3), TSWV; TYLCV
T-66	non-commercial	IR: Fol (1, 2); SC: Fol (3), TSWV; TYLCV

R: resistance; IR: intermediate resistance; HR: high resistance; SC: susceptible; Fol: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*; TSWV: *Tomato Spotted wilt virus*; TYLCV: *Tomato yellow leaf curl virus*. Resistance/Susceptibility was analyzed using the protocols developed by [18].

3.2. Analysis of Internal and External Color

In all the hybrids, the external color values of the hue angle were found between 30 and 60°, which means that the tomato fruit's color is red, and the values of chromaticity were between 30 and 40, which means that the red color is intense (Figure 1A–C). In the case of the internal color, the values of the hue angle were between 18 and 32, and the values of the chromaticity were between 18 and 30 (Figure 1D–F). These data indicate that

the internal color is also red but less intense than the peel or external color. The closer the chromaticity values are to 60, the purer or more intense the color. The developing hybrid 117 had the highest external chromaticity values during the three harvest dates between 39 and 35, and the developing hybrid 118 had the highest internal chromaticity values during the three harvest dates between 31 and 27, while the commercial hybrid T142 had the lowest external and internal chromaticity values between 31 and 28 and 21 and 18, respectively (Figure 2A,C). On the first and second harvest dates, the hue angle values were lower compared to the third harvest date. In the third harvest date for most of the hybrids, the external and internal hue angle values were the highest, which means that during this harvest date, the tomato fruits were less red than in the previous harvest date (Figure 2B,D).

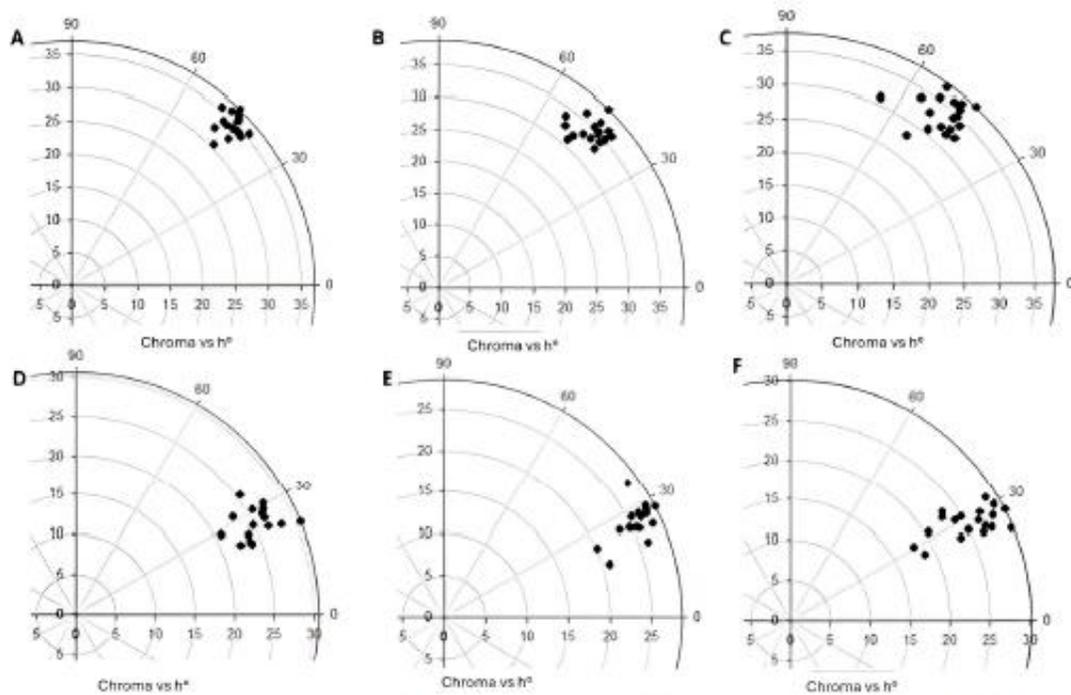


Figure 1. Polar plot of the external and internal colors (h° & chroma) for the three harvest dates. (A) An external color of the first harvest date; (B) the external color of the second harvest date; (C) the external color of the third harvest date; (D) the internal color of the first harvest date; (E) the internal color of the second harvest date; (F) the internal color of the third harvest date.

3.3. Analysis of Total Soluble Solids, Firmness, pH and Titratable Acidity

Even though no statistically significant differences were observed in the amount of TSS among the three dates of harvest (Table 2), in the T-128, T-132, and T-140 hybrids, an increased TSS content was observed on the second harvest date from 6 to 7 °Brix, but on the third harvest date the TSS of T-132 and T-140 was reduced to 6 °Brix except for T-128, which remained at seven °Brix (Figure 3A (Supplementary Table S1)). Fruit firmness was the parameter that showed the greatest variation during the three harvesting dates. On the first date, it ranged from 4.7 to 9.5 N; on the second, from 5.6 to 10.8 N; and on the third, from 7.0 to 14.8 N. The hybrids T-128, T-140, and T-142 were the ones with the highest firmness values on the third harvesting date, with 14.8, 14.3, and 14.2 N, respectively (Figure 3B) (Supplementary Table S2).

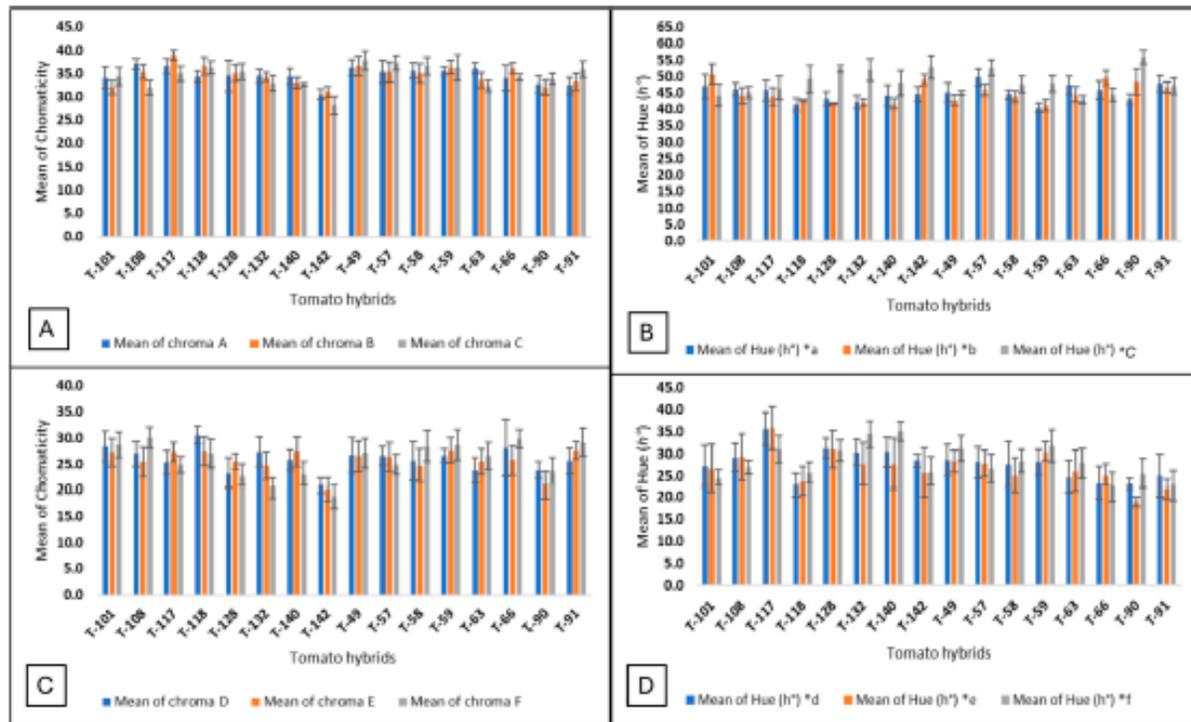


Figure 2. Bar plots of the external and internal chromaticity and hue angle for the three harvest dates. (A) External chromaticity; (B) external hue angle; (C) internal chromaticity; (D) internal hue angle (chroma A, external chromaticity of the harvest date; chroma B, external chromaticity of the second harvest date; chroma C, external chromaticity of the third harvest date; chroma D, internal chromaticity of harvest date; chroma E, internal chromaticity of the second harvest date; chroma F, internal chromaticity of the third harvest date) (hue (h°) a*, external angle hue of the first harvest date; hue (h°) b*, external angle hue of the second harvest date; hue (h°) c*, external angle hue of the third harvest date; hue (h°) d, internal angle hue of the first harvest date; hue (h°) e, internal angle hue of the second harvest date; hue (h°) f, internal angle hue of the third harvest date).

Table 2. Analysis of variance: titratable acidity, total soluble solid, firmness, pH, external and internal chromaticity, and hue angle.

Source	DF	Seq SS	Contribution	Adj SS	Adj MS	F-Value	p-Value
External chromaticity							
Genes	1	0.000631	1.10%	0.000631	0.000631	0.93	0.364
Harvest dates	2	0.04666	81.29%	0.04666	0.02333	34.25	0 *
Hybrids × Harvest dates	18	0.004663	8.12%	0.004663	0.000259	0.38	0.958
Error	8	0.005449	9.49%	0.005449	0.000681		
Total	29	0.057403	100.00%				
External hue angle (h°)							
Genes	1	4.001	1.90%	4.001	4.001	0.22	0.653
Harvest dates	2	12.125	5.77%	12.125	6.062	0.33	0.728
Hybrids × Harvest dates	18	46.916	22.32%	46.916	2.606	0.14	1
Error	8	147.117	70.00%	147.117	18.39		
Total	29	210.159	100.00%				

Table 2. Cont.

Source	DF	Seq SS	Contribution	Adj SS	Adj MS	F-Value	p-Value
Internal chromaticity							
Genes	1	4.001	1.90%	4.001	4.001	0.22	0.653
Harvest dates	2	12.125	5.77%	12.125	6.062	0.33	0.728
Hybrids × Harvest dates	18	46.916	22.32%	46.916	2.606	0.14	1
Error	8	147.117	70.00%	147.117	18.39		
Total	29	210.159	100.00%				
Internal hue angle (h°)							
Genes	1	1.517	0.46%	1.517	1.517	0.05	0.826
Harvest dates	2	14.4	4.33%	14.4	7.2	0.24	0.789
Hybrids × Harvest dates	18	80.741	24.27%	80.741	4.486	0.15	1
Error	8	236.076	70.95%	236.076	29.509		
Total	29	332.734	100.00%				
Titrateable Acidity (%)							
Genes	1	0.000631	1.10%	0.000631	0.000631	0.93	0.364
Harvest dates	2	0.04666	81.29%	0.04666	0.02333	34.25	0 *
Hybrids × Harvest dates	18	0.004663	8.12%	0.004663	0.000259	0.38	0.958
Error	8	0.005449	9.49%	0.005449	0.000681		
Total	29	0.057403	100.00%				
Total soluble solids ($^\circ$ Brix)							
Genes	1	0.1673	0.90%	0.1673	0.1673	0.17	0.693
Harvest dates	2	4.0372	21.80%	4.0372	2.0186	2.02	0.194
Hybrids × Harvest dates	18	6.3411	34.23%	6.3411	0.3523	0.35	0.968
Error	8	7.9771	43.07%	7.9771	0.9971		
Total	29	18.5227	100.00%				
Firmness (N)							
Genes	1	1.26	0.67%	1.26	1.26	0.22	0.652
Harvest dates	2	84.547	44.78%	84.547	42.274	7.34	0.015 *
Hybrids × Harvest dates	18	56.951	30.16%	56.951	3.164	0.55	0.861
Error	8	46.052	24.39%	46.052	5.756		
Total	29	188.811	100.00%				
pH units							
Genes	1	0.009538	1.42%	0.009538	0.009538	0.7	0.426
Harvest dates	2	0.462261	69.00%	0.462261	0.23113	17.04	0.001 *
Hybrids × Harvest dates	18	0.089586	13.37%	0.089586	0.004977	0.37	0.963
Error	8	0.10851	16.20%	0.10851	0.013564		
Total	29	0.669895	100.00%				

DF, degree of freedom; Seq. SS, sequential sums of squares; Adj SS, adjusted sums of squares *, indicates significant differences.

The value of pH decreased in almost all hybrids on the second date of harvest. pH intervals varied between 4.62 to 4.79 and 4.18 to 4.53. The T-140 hybrid was the only one that maintained a constant pH in the three harvesting dates (Figure 3C) (Supplementary Table S3). An increased percentage of acidity was also observed on the second and third harvesting dates, ranging between 0.119 and 0.151% of citric acid to a range between 0.143 and 0.245% (Figure 3D) (Supplementary Table S4). The ratio of total soluble solids to titrateable acidity is important in defining flavor differences between tomato hybrids and affects consumer acceptability. The highest values of the TSS/titrateable acidity ratio were observed at the first harvesting date, and all developing hybrids had higher values than the commercial hybrid T-140 (Figure 3E) (Supplementary Table S5).

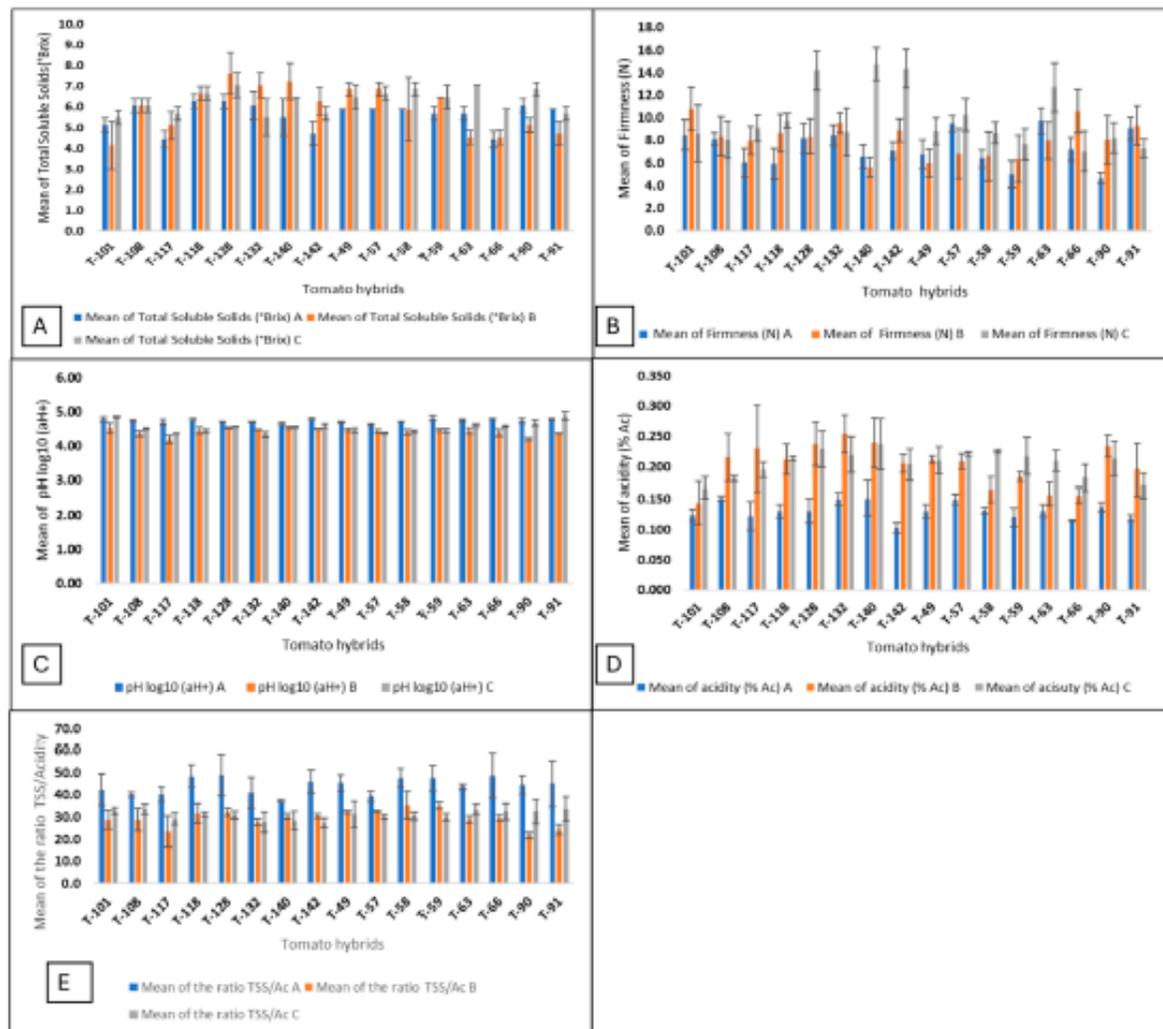


Figure 3. Bar plots of the three harvest dates. (A) Total soluble solid; (B) firmness; (C), pH; (D) acidity; (E) ratio TSS/acidity (A, first harvest date; B, second harvest date; C, third harvest date).

4. Discussion

In the case of tomatoes, the red color is an indicator of taste quality for the consumer [19]. Based on the hue angle values ranging from 0 to 360° representing the color of the fruit where the red color is represented by values below 50°, the closer the hue angle values of tomato fruit are to 0, the redder it is [17]. In the third harvest date for most of the hybrids, both external and internal hue angle values were highest, which means that during this harvest date, the tomato fruits were less red than in the previous harvest dates. That could be because the plants are no longer producing the same amounts of ethylene due to their age [20]. Our values of hue angle and chromaticity were like the values observed by other authors [21]. The increase in TSS in tomato fruit is due to the breakdown of the starch, pectin, and sucrose chain present in the fruit at the green to ripe stage, where this phenomenon provides individual glucose and fructose structures in ripe fruits originating the sweet taste [22,23]. Ref. [24] mentioned that the titratable acidity value of tomato ranges between 0.34 and 0.35%; however, this value tends to decrease as the ripening process advances. In this work, we obtained a lower acidity value than the

above-mentioned, which could be due to the ripening stage at which we harvested the tomato fruits, which were red-ripe. Taste and flavor are increasingly recognized as key components of tomato marketability, so more emphasis is now being placed on improving traits such as TSS, acidity, and pH content in tomatoes. TSS is one of the most important factors that determines fruit quality and affects the preferences of consumers [16,23]. That is why, regardless of the date of harvest, TSS should be stable in hybrids that are going to the fresh market. For tomatoes, several authors indicate an average pH between 3.78 and 5.25 [25–29]. Ref. [30] mentions that the pH of ripe tomatoes can exceed 4.6. In our study, no significant differences were observed between the TSS of three harvesting dates. Our pH values exceed 4.6 but are within the range mentioned by those authors.

Fruit firmness is another of the most important factors in determining tomato quality. The USDA mentions that tomato fruits must be firm to be marketable [29]. We confirmed that most of the hybrid tomatoes analyzed in this study met market standards in this respect, as most of our firmness values were similar or higher than those found by other authors [31,32]. It is very difficult to determine the texture of the inner structure of the fruits by hand, even if some fruit looks very firm when touched by hand, so to determine the exact firmness of the fruits, a tetramer is needed [17]. The fruit firmness values of this study were higher than those obtained by [32], who found an increase in firmness from 4.71 to 7.28 N when they analyzed three different hybrids in five different maturity stages. According to [33], ripe tomato fruits with a firmness equal to or greater than 11 Newtons are considered very firm and, consequently, have a longer shelf life. In reference to the TSS/acidity ratio, it resulted in higher values in fruits with red aril; this factor is determined by the sweet and sour balance of the fruit [34]. An increase in these two organic constituents results in a consequent increase in flavor intensity. Particularly when sugar concentration increases, flavor acceptability increases significantly. A high value of this ratio correlates with a mild flavor, while low values correlate with a sour flavor. Consumer acceptability tends to decrease with acid added at a given sugar concentration [35]. Many countries have developed different quality standards to facilitate and ensure the exchange of products and to define with precision the main aspects involved. For example, the United States government reports its standards for the importation of fresh tomatoes [29]. In the case of Mexico, the MCS tomato standard [28] indicates the different requirements of the product for sale to the consumer. Based on these two standards, the tomato hybrids that we analyzed during the three harvest dates met market standards. Statistically significant differences were observed among the three dates of harvest for these parameters: firmness, pH, titratable acidity, and external color. No statistically significant differences were observed in the number of pathogen resistance genes present in the hybrids, nor was there any possibility that these genes would affect the quality of tomato fruit produced by these hybrids on the three harvest dates. The tomato hybrids analyzed maintain high fruit quality regardless of the number of resistance genes. This result was expected because these hybrids are advanced lines that were already genetically cleaned up to maintain quality after gene introgression.

5. Conclusions

The results show that hybrids T-128 and T-132 best meet the requirements for the fresh market and are in early maturation. This study confirmed that most of the tomato hybrids analyzed during the three harvesting dates met the United States and Mexico standards to be sold to consumers.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/horticulturae10080839/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, R.L., C.V. and J.L.-E.; Methodology, R.L., J.B.V.-T., R.S.G.-E. and M.A.B.S.; Software, R.L. and J.B.V.-T.; Validation, R.L., J.B.V.-T., R.S.G.-E. and M.A.B.S.; Formal analysis, R.L., J.B.V.-T., M.A.B.S. and J.L.-E.; Investigation, R.L. and M.J.E.-A.; Resources, R.S.G.-E., M.A.B.S. and J.L.-E.; Data curation, R.L., J.B.V.-T. and M.A.B.S.; Writing—original draft, R.L.;

Writing—review and editing, R.L., C.V., J.B.V.-T., R.S.G.-E., M.A.B.S., M.J.E.-A. and J.L.-F.; Visualization, C.V., M.A.B.S., M.J.E.-A. and J.L.-F.; Supervision, C.V., J.B.V.-T., R.S.G.-E., M.J.E.-A. and J.L.-F.; Project administration, J.L.-F.; Funding acquisition, J.L.-F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Culiacán, grant number 2018110477.

Data Availability Statement: The original contributions presented in the study are included in the article/supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

Acknowledgments: The authors are grateful to Juan Lopez Santiago for providing infrastructure and technical support for the development of this research. They also thank Rosalba Contreras Martínez and Jesús Héctor Carrillo Yáñez for their support in the technical procedures.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study, in the collection, analyses, or interpretation of data, in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

- Jenkins, J.A. The origin of the cultivated tomato. *Econ. Bot.* **1948**, *2*, 379–392. [CrossRef]
- Blancard, D.; Laterrot, H.; Marchoux, G.; Candresse, T. *Enfermedades del Tomate: Identificar, Conocer, Controlar*; Mundi-Prensa México S.A de C.V.: Mexico City, México, 2011.
- Peralta, I.; Spooner, D.M.; Knapp, S. Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sections *lycopersicoides*, *Juglandioidia*, *Lycopersicon*; Solanaceae). *Syst. Bot. Monogr.* **2008**, *84*, 1–186.
- Tanksley, S.D.; McCouch, S.R. Seed banks and molecular maps: Unlocking genetic potential from the wild. *Science* **1997**, *277*, 1063–1066. [CrossRef] [PubMed]
- Knudsen, H. *Directorio de Colecciones de Germoplasma en América Latina y el Caribe*, 1st ed.; Colectar las razas nativas más antiguas, con el fin de conservar el patrimonio nacional biocultural; International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI): Rome, Italy, 2000.
- Engels, J.M.; Visser, L. *Guía para el Manejo Eficaz de un Banco de Germoplasma*; Manuales para Bancos de Germoplasma No. 6. (eds); Bioversity International: Rome, Italy, 2007.
- SIAP. 2022. Available online: https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2022/Panorama-Agroalimentario-2022 (accessed on 10 May 2023).
- Detweiler, A.J.; Noordijk, H.; Bell, N.N.C.; Bubl, C.E. 2014. Available online: <https://extension.oregonstate.edu/sites/default/files/documents/ec1333-s.pdf> (accessed on 10 May 2023).
- United States Department of Agriculture. Plants Database. 2023. Available online: <http://plants.usda.gov> (accessed on 5 August 2024).
- FAOSTAT; FAO. 2023. Available online: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize> (accessed on 5 August 2024).
- Ascencio-Álvarez, A.; López-Benítez, A.; Borrego-Escalante, F.; Rodríguez-Herrera, S.; Flores-Olivas, A.; Jiménez-Díaz, E.; Gámez-Vázquez, A. Marchitez Vascular del Tomate: I. Presencia de Razas de *Fusarium oxysporium* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen en Culiacán, Sinaloa, México. *Rev. Mex. Fitopatol.* **2008**, *26*, 114–120.
- Al Abdallat, A.M.; Al Debei, H.S.; Asmar, H.; Misbeh, S.; Quraan, A.; Kvarnheden, A. An efficient in vitro-inoculation method for Tomato yellow leaf curl virus. *Virology* **2010**, *7*, 84. [CrossRef] [PubMed]
- Lugo-Melchor, O.Y.; Guzmán-Urriarte, R.; García-Estrada, R.S.; León-Félix, J.; Josefina, L.F. Geminivirus Transmitidos por Mosca Blanca (*Bemisia tabaci*) en Tomate, en el Valle Agrícola de Culiacán, Sinaloa. *Rev. Mex. Fitopatol.* **2011**, *29*, 109–118.
- Francis, F.J. Quality as influenced by color. *Food Qual. Prefer.* **1995**, *6*, 149–155. [CrossRef]
- Herregods, M. Postharvest market quality preferences for fruit and vegetables. In Proceedings of the XXV International Horticultural Congress, Part 8: Quality of Horticultural Products 518, Brussels, Belgium, 2–7 August 1998; pp. 207–212.
- A.O.A.C. *Association of Official Analytical Chemists: Official Methods of Analysis*, 16th ed.; AOAC: Washington, DC, USA, 1998.
- Lafrance, R.; Valdez-Torres, J.B.; Villicaña, C.; García-Estrada, R.S.; Esparza-Araiza, M.J.; León-Félix, J. Response Surface Methodology for Optimization of Multiplex-PCR Protocols for Detection of TYLCV, TSWV and Fol Molecular Markers: Analytical Performance Evaluation. *Genes* **2023**, *14*, 337. [CrossRef]
- Ahumada, O.; Villalobos, J.R. Operational model for planning the harvest and distribution of perishable agricultural products. *Int. J. Prod. Econ.* **2011**, *133*, 677–687. [CrossRef]
- Pesaresi, P.; Mizzotti, C.; Colombo, M.; Masiero, S. Genetic regulation and structural changes during tomato fruit development and ripening. *Front. Plant Sci.* **2014**, *5*, 82777. [CrossRef] [PubMed]
- Lifero, O.; Ciudad, M.; Arana, G.; Nguyen, C.; de Diego, A. The use of a standard digital camera as an inexpensive, portable, fast and non-destructive analytical tool to measure colour: Estimation of the ripening stage of tomatoes (*Solanum lycopersicum*) as a case study. *Microchem. J.* **2017**, *134*, 284–288. [CrossRef]
- Wills, R.; McGlasson, B.; Graham, D.; Joyce, D. *Postharvest: An Introduction to the Physiology & Handling of Fruit, Vegetables & Ornamentals*, 4th ed.; Cab International: Wallingford, UK, 1998.

22. Beckles, D.M. Factors affecting the postharvest soluble solids and sugar content of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit. *Postharvest Biol. Technol.* **2012**, *63*, 129–140. [CrossRef]
23. Casierra-Posada, E.; Aguilar-Avenidaño, Ó.E. Calidad en frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cosechados en diferentes estados de madurez. *Agron. Colomb.* **2008**, *26*, 300–307.
24. Cantwell, M.; Stoddard, S.; LeStrange, M.; Aegerter, B. *Report to the California Tomato Comission; Tomato variety trials: Postharvest evaluations for 2006. UCCE Fresh Market Tomato Variety 2006 Trial Postharvest Evaluation*; UC Davis: Davis, CA, USA, 2007; 16p.
25. Chamarro, L.J. Anatomía y fisiología de la planta. In *El Cultivo del Tomate*; Nuez, F., Ed.; Mundi Prensa: Madrid, Spain, 1995; pp. 43–90.
26. Davies, J.N.; Huobson, G.E. The constituents of tomato fruit—the influence of environment, nutrition and genotype. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1981**, *15*, 205–280. [CrossRef] [PubMed]
27. Turhan, A.; Seniz, V. Estimation of certain chemical constituents of fruits of selected tomato genotypes grown in turkey. *Afr. J. Agric. Res.* **2009**, *4*, 1086–1092.
28. MCS (Mexico Calidad Suprema) Tomato 2005. PC-020-2005 Pliego de Condiciones Para el Uso de la Marca Oficial México Calidad Suprema en Tomate. SAGARPA, BANCOMEX, SECRETARIA DE ECONOMIA. *México D.f.* 22p. Available online: http://intranet.dif.cdmx.gob.mx/transparencia/new/art_121/52/_anexos/pliegodecondicionesmanzana.pdf (accessed on 5 August 2024).
29. USDA. United States Standards for Grades of Fresh Tomatoes. 1991. Available online: [https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/Tomato_Standard\[1\].pdf](https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/Tomato_Standard[1].pdf) (accessed on 5 August 2024).
30. Garcia, E.; Barret, M.D. Evaluation of processing tomatoes from two consecutive growing seasons: Quality attributes, peelability and yield. *J. Food Process. Preserv.* **2006**, *30*, 20–26. [CrossRef]
31. Batu, A. Determination of acceptable firmness and colour values of tomatoes. *J. Food Eng.* **2004**, *61*, 471–475. [CrossRef]
32. Meza, N.; Méndez, J.M. Características del fruto de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* [Cav.] Sendtn) basadas en la coloración del arilo, en la Zona Andina Venezolana. *Rev. Científica UIDO Agrícola* **2009**, *9*, 289–294.
33. Castellanos, J.Z. (Ed.) *Manual de Producción de Tomate en Invernadero*; Intagri, S.C.: Celaya, México, 2009; 458p.
34. Martín-Hernández, S.; Ordaz-Chaparro, V.M.; Sánchez-García, P.; Beryl Colinas-Leon, M.T.; Borges-Gómez, L. Calidad de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) producido en hidroponía con diferentes granulometrias de tezontle. *Agrociencia* **2012**, *46*, 243–254.
35. Malundo TM, M.; Shewfelt, R.L.; Scott, J.W. Flavor quality of fresh tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as affected by sugar and acid levels. *Postharvest Biol. Technol.* **1995**, *6*, 103–110. [CrossRef]

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

4. BEHAVIOR OF TOMATO PLANTS DEVELOPED IN SINALOA INOCULATED WITH *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Richecarde Lafrance¹, Claudia Villicaña², José Benigno Valdéz-Torres¹, Raymundo Saúl García Estrada¹, Hernán García-Ruiz⁴, Mayra Janeth Esparza-Araiza³ and Josefina León-Félix^{1*},

¹ Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), A.C., Culiacán, Sinaloa 80110, México; rlafrance220@estudiantes.ciad.mx

² CONACHYT-Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Culiacán, Sinaloa 80110, México; maria.villicana@ciad.mx

³ Centro de Innovación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria de Sinaloa- Fundación Produce Sinaloa, A.C. Aguaruto, Sinaloa 80308, México; mayjanes11@gmail.com

⁴ University of Nebraska-Lincoln, Department of Plant Pathology, Nebraska Center for Virology, Lincoln, Nebraska 68583, USA; hgarciaruz2@unl.edu

* Correspondence: ljosefina@ciad.mx

Abstract: Tomato is the second most important vegetable crop in the world. *Fusarium* wilt (FW) is one of the main biotic stresses in Mexico that limits tomato production. The identification and use of resistant lines to take advantage of the full genetic potential of varieties to increase yield is an ecological approach. In this work, a phenotypic validation of 10 hybrids (two commercial and eight advanced lines with different versions of each) that were genotypically evaluated with the P7-43D marker molecule associated with the *I-3* resistance gene, which allows plants to resist race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, was carried out. For the phenotypic analysis, one month after planting, the plants were inoculated with the Fol race 3 fungi, and after one month, the symptoms were analyzed on a scale of 0 to 4, where 0 means a healthy plant with no symptoms and 4 means a plant with all symptoms and dead. This study provides information on the performance of 22 tomato hybrids, of which HT90-13 and HT132 showed the lowest incidence of *Fol*, highlighting the importance of using them in future breeding work to develop tomato hybrids resistant to this pathogen.

Keywords: tomato, inoculation, phenotypic validation

1. Introduction

Tomato (*S. lycopersicum*) is one of the most important vegetable crops in the world, with over 186 million tons produced worldwide in 2022 and just over 5 million ha harvested (Faostat, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>, accessed on June 17, 2024). Between 2002 and 2022, the global area harvested increased by 25% while production increased by 61.7% (Faostat, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/> visualize, accessed on June 17, 2024). This gain in productivity is the result of research in many areas, notably the improvement of tomato varieties through breeding efforts. In 2022, Mexico was one of the top 10 tomato producing countries with a production of 4,207,889 tons. However, it has been affected by multiple pathogens, especially fungal diseases that reduce yields, fruit quality, shelf life, and nutritional content (Ascencio-Álvarez et al., 2008, Carmona et al., 2020, FOAESTAT accessed on June 17, 2024). In extreme cases and in the absence of resistant varieties, these diseases force farmers to use high amounts of pesticides or to abandon tomato production altogether. Which affects both the health of consumers and the cost of the product in the market (Hanson *et al.*, 2016).

More than 200 pests and diseases have been identified in tomato, which cause losses in its production directly or indirectly (Lukyanenko 1991, Bergougnoux 2014). One of the most important diseases is Fusarium wilt disease, caused by the soil-borne fungus *Fusarium oxysporum*. This disease causes significant yield losses in tomatoes worldwide (Ascencio-álvarez et al., 2008, Carmona et al., 2020). Different *Fusarium* species have been reported as plant pathogens, among the most common are *F. solani*, *F. moniliforme*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. graminearum*, *F. subglutinans* and *F. esquiseti*. *F. oxysporum* isolates have been divided into more than 120 special forms according to their host range (Okungbowa and Shittu 2012)). Isolates of a particular special form can be subdivided into physiological races showing a characteristic pattern of virulence on differential host cultivars. Special forms and races differ in symptomatology, epidemiology and cultivar susceptibility and can be differentiated by pathogenicity tests with appropriate host cultivars (Roncero et al., 2003). The special form *lycopersici* receives this

designation when its specific host is the tomato plant. Resistance genes to vascular wilt in tomatoes caused by *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) have been reported (Houterman et al., 2009; Gonzalez-Cendales et al., 2016). *Fol* survives on crop debris from one season to the next and possesses resistance structures such as chlamydospores, which are vegetative multiplying spores surrounded by a thick wall and containing nutritive substances that ensure the parasite's preservation in the soil for up to six years. The development of the pathogen is favored by warm temperatures associated with high relative humidity, where the fungus is able to penetrate the plant at soil level either through the stem or through the superficial roots and then moves through the vascular bundles to the whole plant (Blancard et al., 2011).

Among the main methods for the control of fungal diseases, including that caused by *Fol*, are strategies that involve cultural practices, the use of chemical, physical and biological agents, as well as the use of natural genetic resistance in different tomato species. The use of a particular strategy depends on various factors, from edaphoclimatic conditions of tomato production to economic ones (Vásquez-Ramírez and Castaño-Zapata, 2017). *Fol*-resistant tomato plants contain race-specific resistance genes to each race of the pathogen, which have been named I for immunity genes, of which *I*, *I-1*, *I-2*, *I-3* and *I-7* confer resistance to race 1 (*I* and *I-1*), races 1 and 2 (*I-2*), and races 1 to 3 (*I-3* and *I-7*) of *Fol* (Houterman et al., 2009; Gonzalez-Cendales et al., 2016).

With the purpose of achieving sustainable agriculture and obtaining high-quality products in terms of food safety, the use of resistant varieties has been implemented for several years as a tool of great impact to reduce the damage caused by pathogens (Sánchez-Peña et al., 2006, Flores-hernández et al., 2017). This can be achieved by genetic improvement through molecular markers, which allow for identifying the presence/absence of a gene of interest in a plant from a young stage, taking less time than morphological markers. However, sometimes a molecular marker can detect a resistance gene in a plant, but it is not being expressed, which means that even with the presence of the resistance gene, the disease continues to cause damage to the plant. Due to this, in this work a phenotypic validation was carried out in 10 tomato hybrids (eight advanced lines developed in Sinaloa and two commercial hybrids) in five of which (4 advanced lines and one commercial hybrid) the *I-3* gene associated with tomato resistance to *Fol* race 3 was detected by means of the P7-43D marker. All hybrids were exposed to the fungus in a controlled area and symptoms were

analyzed considering the scale described by that goes from 0 to 4 where 0 is equivalent to a healthy plant without any symptoms and 4 to a plant with all symptoms and dead.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material

Plants were grown in a soil mixture (coco peat and composted pine bark) in a controlled environment (25 °C, 16h / 20 °C 8h light/dark conditions).

2.2. Reactivation of *Fusarium Oxysporum* Strain

The *Fusarium oxysporum* strain provided by the plant pathology laboratory of the Food and Development Research Center was reactivated and grown on potato dextrose agar (PDA) until the surface of the Petri dish medium was covered by the fungal mycelia. The spore suspension was prepared by flooding the Petri dish (containing the fungal mycelia on PDA) with 10 ml of sterilized distilled water and gently rubbing the mycelia with a sterilized loop to release the spores.

2.3. Inoculation of the Hybrids with *Fol* race 3

Seedlings were removed from the growing mix and their roots were washed with water, trimmed approximately two centimeters from the tip of the roots, and dipped in a conidial suspension of 1

x 10⁶ conidia per mL for 10 min before replanting in a coconut fiber mix similar to that in which they were previously planted. Roots of control plants were dipped in water for mock inoculation to ensure that the disease phenotypes were a consequence of *Fol* infection, rather than the inoculation process per se. After inoculation, plants were maintained in a controlled environment growth room with a 16 h, 25°C Day / 8 h, 20°C night cycle.

2.4. Pathogen Testing

Stem samples were collected from tomato seedlings with symptoms typical of vascular wilt disease caused by *Fol*. The collected stems were placed in polyethylene bags and then transferred to the Phytopathology Laboratory of the Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) Culiacán unit. Longitudinal cuts were made to the stem to observe symptoms of internal brown necrosis in the conducting vessels and then stem sections of approximately 3 mm were cut. These stems were disinfected with a 1% sodium hypochlorite solution for 3 min, then seeded on potato dextrose agar (PDA) culture medium in Petri dishes and incubated at 25 °C for eight days. The pathogen was verified by its morphological characteristics of mycelium and conidia in culture medium.

2.5. Response of Different Tomato Breeding Lines to *Fol* Infection

Tomato breeding lines and commercial hybrids where the genes of resistance to *Fol*, *I-3* was detected by molecular marker analysis (Lafrance *et al.*, 2024), was tested in this study for their reaction to *Fol* infections. For comparative purposes, one line; Bonny Best which is known to be susceptible to *Fol*, obtained from Dr Raymundo Saúl García Estrada (Department of plant pathology, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), A.C., Culiacán, Sinaloa,

Mexico), was also included. Plants were mechanically inoculated with *Fol* as mentioned above and kept in an insect-proof greenhouse.

After 30 days, wilt symptoms and vascular browning will be recorded and used to calculate disease scores according to the following criteria described by Rep *et al.* (2004):

0	no reaction, healthy plant
1	hypocotyl is slightly swollen or bent
2	one or two brown vascular bundles in the hypocotyl
3	at least two brown vascular bundles and growth distortion
4	all vascular bundles are brown; the plant is dead or very small and wilted.

The response of individual plants within each accession was transformed into a disease index (DI) by dividing the sum of the ratings for each plant by the total number of plants. This disease index was used to discriminate accessions into five reaction classes: immune-type response (ILR), ordinal grade = 0; high resistance (HR), grade 0.01 to 1.00; intermediate resistance (IR), grade 1.01 to 2.00; susceptible (SU), grade 2.01 to 3.00; and very susceptible (HS) grade 3.01 to 4.00. The disease index was calculated, using the following formula that was modified from Mc Kinney in 1923.

$$DI = \frac{\varepsilon(\text{Severity rating} \times \text{Plant No at that rating})}{\text{Total plant No} \times \text{Higher rating}} \times 100$$

3. Results

3.1. Severity of *Fol*

One way to measure the damage caused by *Fol* in tomato plantations is through the disease index,

which measures the number of affected plants expressed as a percentage and is also used to determine resistance to this pathogen. After 30 days of culture, inoculated tomato seedlings were examined and classified according to disease symptoms. The symptoms were more severe, according to the calculated disease index (DI), in Bonny best plants inoculated with *Fol* strain race 3 (DI value of 72.5), most of the plants died the rest wilted the entire leaf of the plant in the root necrosis was observed (Table 1) (Figure 2B) this was the result we were expecting because Bonny best is susceptible to all *Fol* races including race 3. SVTE8444 seedlings inoculated with *Fol* race 3 (DI value of 62.5) also showed wilt symptoms. However, the fungus only affected part of the plants and several of them died this result was not the expected result because SVTE8444 is considered as a *Fol* race 3 resistant hybrid. Hybrids HT90-13 and HT132 showed very few wilt symptoms in their seedlings (DI values of 5.0 and 7.5, respectively) (Table 1) (Figure 1). In the case of HT132, this result is understandable because when this hybrid was tested with the molecular marker P7-43D associated with the I-3 gene for resistance to *Fol* race 3 it gave a positive result. However, the opposite was true for HT90-13 when analyzed with the P7-43D marker, which gave a negative result. It was expected that HT132 would show resistance to *Fol* but not HT90-13. Because when analyzed with the molecular marker P7-43D the presence of the marker was shown on HT132 but not in HT90-13 (Lafrance *et al.*, 2024). Tomato seedlings inoculated with sterile water as a control and showed no wilt symptoms (Figure 2A). Statistical analyses indicated a significant difference between the DI of the different hybrids (Table 2).

Table 1. Disease indices in tomato plants inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, race 3 strain.

Hybrids	* Disease Index (DI)	Hybrids	* Disease Index (DI)
HT132A	7.5 ^c	HT58 A	15.0 ^c
HT132B	42.5 ^{a,b}	HT59	37.5 ^{a,b,c}
PV 33	15.0 ^c	HT90-6	25.0 ^{b,c}
HT90-26	22.5 ^c	HT90-8	22.5 ^c
HT90-28	30.0 ^{b,c}	HT90-13	5.0 ^c
BONNY BEST	72.5 ^a	HT90-22	15.0 ^c
SVTE8444	62.5 ^{a,b}	HT58 B	17.5 ^c

HT90-23	40.0 ^{a,b,c}	HT118 C	27.5 ^{b,c}
HT90-24	35.0 ^{a,b,c}	PV 17	30.0 ^{b,c}
HD63 A	42.5 ^{a,b,c}	HT118 A	37.5 ^{a,b,c}
HD63 B	12.5 ^c	HT118 B	32.5 ^{b,c}
Uninoculated control	0.0		

* Tukey Pairwise Comparisons Method with 95% Confidence. Different letters (a,b,c,) indicate significant differences from each other. Values obtained from the uninoculated control (zero) were excluded from the analyses of variance.

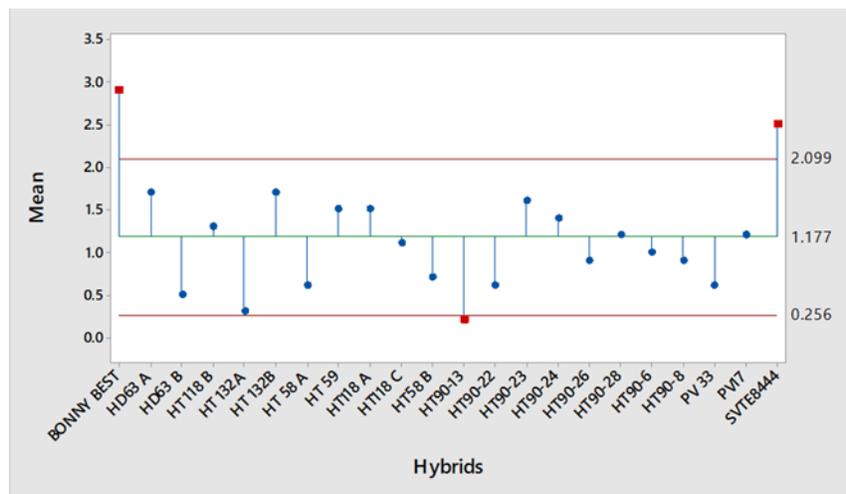


Figure 1. Normal ANOM for the severity index Disease

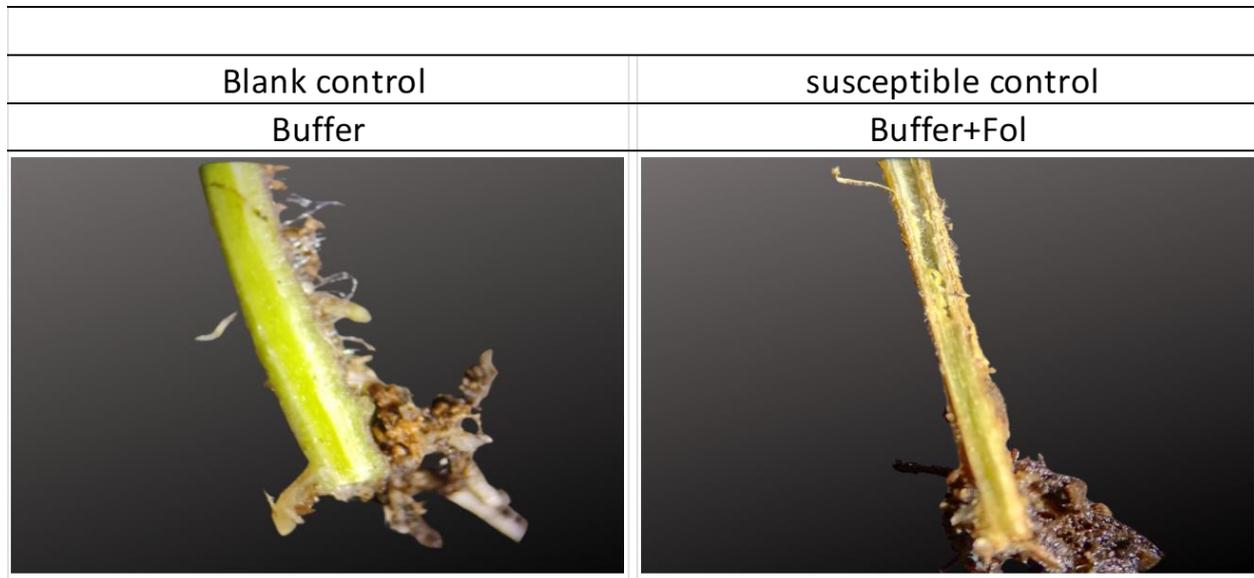


Figure 2. Experimental assays for pathogenicity of the *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, race 3 (*Fol* race 3) strain in tomato seedlings. Non-inoculated control (A) and disease symptoms of tomato seedlings 30 days after inoculation with the strain *Fol* race 3 (B).

3.2. Analysis of Variance

The significance of the statistical model terms was assessed by their corresponding P-value. P-value less than 0.05 indicates that the term was significant and value greater than 0.05 indicates that the term was not significant (Myers, Montgomery, y Anderson-Cook, 2016). Analysis of variance (ANOVA) and was used to assess the statistical significance of the model (Singh Boparai et al., 2016). In Table 2 of ANOVA based on the P value, statistically significant differences were observed among the hybrids tested.

Table 2. analysis of Variance.

Source	DF	Seq SS	Contributi on	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Hybrids	21	93.19	33.51%	93.19	4.4374	4.75	0
Error	198	184.9	66.49%	184.9	0.9338		
Total	219	278.09	100.00%				

Figure 3 showed that the distribution of the residuals was normal, the histogram had a bell shape, the residuals were well distributed, and did not follow a pattern. Therefore, it was intended that the experiment was well designed (Myers et al., 2016).

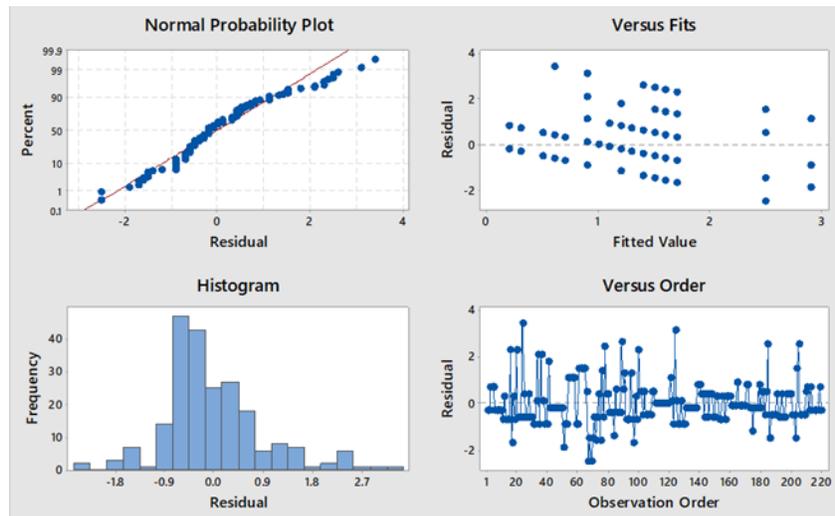


Figure 3. Residual plots of the statistical design.

3.3. Pathogen Testing

Isolates obtained from plants with typical symptoms of the disease produced colonies on PDA culture medium with floccose, scattered and abundant aerial mycelium, varying in white to pale violet color, with abundant short and medium length, falcate, thin-walled and septate macroconidia (Figure 4). These characteristics coincide with those described by Leslie and Summerell (2006) for the morphological identification of *Fusarium oxysporum*, in addition to the symptomatology observed in inoculated tomato plants, which allowed us to verify that it was really the fungus *Fol* race 3.

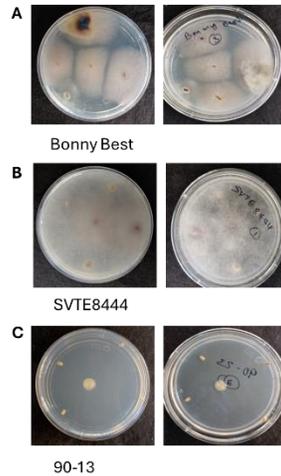


Figure 4. Isolates obtained from plants with (A,B) and without (C) symptoms of the disease.

4. Conclusion

This study provides information on the performance of 22 tomato hybrids, of which HT90-13 and HT132 showed the lowest incidence of *Fol*, highlighting the importance of using them in future breeding work to develop tomato hybrids resistant to this pathogen.

5. Referencias

- Ascencio-álvarez, A., López-Benítez, A., Borrego-Escalante, F., Rodríguez-Herrera, S., Flores-Olivas, A., Jiménez-Díaz, F., & Gámez-Vázquez, A. (2008). Marchitez Vascular del Tomate: I. Presencia de Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen en Culiacán, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 26(2), 114–120.
- Anfoka, G. H., Abhary, M., & Stevens, M. R. (2006). Occurrence of Tomato spotted wilt virus (TSWV) in Jordan. *EPPO Bulletin*, 36(3), 517-522.
- Bergougnoux, V. (2014). The history of tomato: from domestication to biopharming. *Biotechnology advances*, 32(1), 170-189.
- Blancard, Dominique Laterrot, H., Marchoux, G., & Candresse, T. (2011). *Enfermedades del tomate: Identificar, conocer, controlar*. Ciudad de México: Mundi-Prensa México S.A de C.V.

- Carmona, S. L., Burbano-David, D., Gómez, M. R., Lopez, W., Ceballos, N., Castaño-Zapata, J., & Soto-Suárez, M. (2020). Characterization of pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* isolates associated with commercial tomato crops in the Andean region of Colombia. *Pathogens*, 9(1), 70.
- FAOSTAT. (2024). FAO. Recuperado de <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize>. accessed on June 17, 2024
- Flores-Hernández, L.A.; Lobato-Ortiz, R.; García-Zavala, J.J.; Molina-Galán, J.D.; Sargerman-Jarquín, D.M.; Velasco-Alvarado, M.d.J. Parientes silvestres del tomate como fuente de germoplasma para el mejoramiento genético de la especie. *Rev. Fitotec. Mex.* 2017, 40, 83–91.
- Gonzalez-Cendales, Y., Catanzariti, A. M., Baker, B., Mcgrath, D. J., & Jones, D. A. (2016). Identification of I-7 expands the repertoire of genes for resistance to *Fusarium* wilt in tomato to three resistance gene classes. *Molecular Plant Pathology*, 17(3), 448-463.
- Hanson, P., Lu, S. F., Wang, J. F., Chen, W., Kenyon, L., Tan, C. W., ... & Ledesma, D. (2016). Conventional and molecular marker-assisted selection and pyramiding of genes for multiple disease resistance in tomato. *Scientia Horticulturae*, 201, 346-354.
- Houterman, P. M.; Ma, L.; Van Ooijen, G.; De Vroomen, M. J.; Cornelissen, B. J. C.; Takken, F. L. W. and Rep, M. 2009. The effector protein Avr2 of the xylem-colonizing fungus *Fusarium oxysporum* activates the tomato resistance protein I-2 intracellularly. *Plant J.* 58(6):970-978. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03838.x>.
- Lafrance, R., Villicaña, C., Valdéz-Torres, J.B., Martínez-Montoya, H., Castillo-Ruiz, O., Alemán-Castillo, S.E., Esparza-Araiza, M.J., León-Félix, J., (2024). Selection of tomato (*Solanum Lycopersicum*) hybrids resistant to Fol, TYLCV, TSWV, with early maturity and good fruit quality. *Horticulturae*, 10(8), 839.
- Leslie, J. F. and Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium laboratory manual*. Oxford: Blackwell Science. 212 p.
- Lukyanenko, A. N. (1991). *Disease resistance in tomato*. In *Genetic improvement of tomato* (pp. 99-119). Springer, Berlin, Heidelberg.
- McKinney, H.H (1923). Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *J. Agric. Res.*, 26, 195–225.
- Myers, R. H., Montgomery, D. C., & Anderson-Cook, C. M. (2016). *Response Surface Methodology: process and Product Optimization Using Designed Experiments* (4th ed.). New Jersey: John Wiley & Sons.
- Okungbowa, F. I., & Shittu, H. O. (2012). *Fusarium* wilts: An overview. *Environ. Res. J.* 6(2), 83-102.
- Rep, M.; van der Does, H. C.; Meijer, M.; van Wijk, R.; Houterman, P. M.; Dekker, H. L.; de Koster, C. G. and Cornelissen, B. J. 2004. A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. *Mol Microbiol.* 53(5):1373-1383. Doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04177.x
- Sánchez-Peña, P., Oyama, K., Núnéz-Farfán, J., Fornoni, J., Hernández-Verdugo, S., Márquez-Guzmán, J., & Garzón-Tiznado, J. A. (2006). Sources of resistance to whitefly (*Bemisia* spp.)

in wild populations of *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* (Dunal) spooner G. J. Anderson et R. K. Jansen in Northwestern Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53, 711–719. <https://doi.org/10.1007/s10722-004-3943-9>

Singh Boparai, K., Singh, R., & Singh, H. (2016). Modeling and optimization of extrusion process parameters for the development of Nylon6 – Al – Al₂O₃ alternative FDM filament Inspection and Testing. *Progress in Additive Manufacturing*, 1(1), 115–128.

Vásquez-Ramírez, L. M., & Castaño-Zapata, J. (2017). Manejo integrado de la marchitez vascular del tomate [*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (SACC.) WC SNYDER & HN HANSEN]:: una revisión. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 20(2), 363-374.

5. REFERENCIAS

- A.O.A.C. (1998). Association of Official analytical chemists: Official methods of analysis (16th ed.). Fourth Edition: Washington
- Agrios, G. (2005). Introducción a la Fitopatología. *Fitopatología. Editorial Limusa Noriega. Segunda edición, México, DF*, 3-36.
- Ahmad, R., Anjum, M. A., & Balal, R. M. (2020). From markers to genome based breeding in horticultural crops: an overview.
- Al Abdallat, A. M., Al Debei, H. S., Asmar, H., Misbeh, S., Quraan, A., & Kvarnheden, A. (2010). An efficient in vitro-inoculation method for Tomato yellow leaf curl virus. *Virology Journal*, 7(1), 1–9
- Almeida, I. B. P., & Gratero, L. R. A. (2021). Marcadores moleculares como apoyo al fitomejoramiento. *TAYACAJA*, 4(2), 83-89.
- Alon, H., Katan, J., & Kedar, N. (1974). Factors affecting penetrance of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomatoes. *Phytopathology*, 64(455), 61.
- Ammara, U. E., Mansoor, S., Saeed, M., Amin, I., Briddon, R. W., & Al-Sadi, A. M. (2015). RNA interference-based resistance in transgenic tomato plants against *Tomato yellow leaf curl virus*-Oman (TYLCV-OM) and its associated betasatellite. *Virology Journal*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0263-y>
- Anfoka, G. H., Abhary, M., & Stevens, M. R. (2006). Occurrence of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) in Jordan. *EPPO Bulletin*, 36(3), 517-522.
- Ascencio-álvarez, A., López-Benítez, A., Borrego-Escalante, F., Rodríguez-Herrera, S., Flores-Olivas, A., Jiménez-Díaz, F., & Gámez-Vázquez, A. (2008). Marchitez Vascular del Tomate: I. Presencia de Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen en Culiacán, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 26(2), 114–120.
- Ascencio-Álvarez, A.; López-Benítez, A.; Borrego-Escalante, F.; Rodríguez-Herrera, S.; Flores-Olivas, A.; Jiménez-Díaz, F.; Gámez-Vázquez, A. Marchitez Vascular del Tomate: I. Presencia de Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen en Culiacán, Sinaloa, México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 2008, 26, 114–120.
- Baquela, E. G., & Redchuk, A. (2013). *Optimización Matemática con R. Volumen I: Introducción al modelado y resolución de problemas* (1a edición). Madrid: Editor Bubok Publishing S.L.
- Bas, D., & Boyaci, I. H. (2007). Modeling and optimization I : Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78(3), 836–845.
- Bergougnot, V. (2014). The history of tomato: from domestication to biopharming. *Biotechnology advances*, 32(1), 170-189.
- Blancard, Dominique Laterrot, H., Marchoux, G., & Candresse, T. (2011). *Enfermedades del tomate: Identificar, conocer, controlar*. Ciudad de México: Mundi-Prensa México S.A de C.V.

- Burbano-Figueroa, Ó. (2020). Resistencia de plantas a patógenos: una revisión sobre los conceptos de resistencia vertical y horizontal. *Revista argentina de microbiología*, 52(3), 245-255.
- Caro, M., Verlaan, M. G., Julián, O., Finkers, R., Wolters, A. M. A., Hutton, S. F., ... Bai, Y. (2015). Assessing the genetic variation of Ty-1 and Ty-3 alleles conferring resistance to tomato yellow leaf curl virus in a broad tomato germplasm. *Molecular Breeding*, 35(6), 132.
- Catanzariti, A. M., Do, H. T., Bru, P., de Sain, M., Thatcher, L. F., Rep, M., et al. (2017). The tomato *I* gene for fusarium wilt resistance encodes an atypical leucine-rich repeat receptor like protein whose function is nevertheless dependent on SOBIR1 and SERK3/BAK1. *The Plant Journal*, 89(6), 1195–1209. <https://doi.org/10.1111/tpj.13458>
- Catanzariti, A. M., Lim, G. T., & Jones, D. A. (2015). The tomato *I-3* gene: A novel gene for resistance to fusarium wilt disease. [research support, non-U.S. Gov't]. *The New Phytologist*, 207(1), 106–118. <https://doi.org/10.1111/nph.13348>.
- Chitwood-Brown, J., Vallad, G. E., Lee, T. G., & Hutton, S. F. (2021). Breeding for resistance to Fusarium wilt of tomato: A review. *Genes*, 12(11), 1673.
- Detweiler, A. J., Noordijk, H., Bell, N. N. C., & Bubl, C. E. (2014). <https://catalog.extension.oregonstate.edu/ec1333s>
- Dias, V. D., Oliveira, R. M. D., Dianese, É. D. C., Boiteux, L. S., & Cunha, M. G. D. (2016). Detecção simultânea de fatores de resistência à murcha de fusário do tomateiro por meio de PCR multiplex. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 51(8), 925-932.
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1990). Doyle&Doyle_Focus_1990_CTAB.pdf. 13–15.
- Ebert, A.W., Chou, Y.Y., (2015). The tomato collection maintained by AVRDC - The World Vegetable center: Composition, germplasm dissemination and use in breeding. *Acta Hortic.* 1101, 169–176. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1101.26>
- Engels, J. M. ., & Visser, L. (2007). *Guía para el manejo eficaz de un banco de germoplama*. Manuales para Bancos de Germoplasma No. 6. (eds). Bioversity International.
- Espinoza, M., Santos, M. E., Múndez, J., & Leyva, N. (2009). Diversidad genómica de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* y *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* en cultivos de tomates en Sinaloa, México. *Fitosanidad*. 13 (1) 22-23.
- FAOSTAT. (2020). FAO. Recuperado de <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize>. Ultima fecha de consulta: 01/04/2021
- FAOSTAT. (2023). FAO. Recuperado de <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize>. (accessed in 2024).
- Félix Urquidez, D., Pérez Urquiza, M., Valdez Torres, J.-B., León Félix, J., García Estrada, R., & Acatzi Silva, A. (2016). Development, Optimization, and Evaluation of a Duplex Droplet Digital PCR Assay to Quantify the T-nos/hmg Copy Number Ratio in Genetically Modified Maize. *Analytical Chemistry*, 88(1), 812–819.
- Francis, F. J. (1995). Quality as influenced by color. *Food quality and preference*, 6(3), 149-155.
- Fu, W., X.R. Xin, Y. Jin and H.X. Wang, (2013). Identification of *Ty-1*, *Ty-2* and *Ty-3* genes of tomato (*Lycopersicon esculentum*) by multiplex PCR. *Chin. Hortic. Abstr.*, 4: 13-15.

- Geng, L., Qian, L., Shao, R., Liu, Y., Liu, S., & Wang, X. (2018). Transcriptome profiling of whitefly guts in response to Tomato yellow leaf curl virus infection. *Virology Journal*, 15(14), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12985-018-0926-6>
- Giovannoni, J. (2018). Tomato multiomics reveals consequences of crop domestication and improvement. *Cell*, 172(1-2), 6-8.
- Gómez Jaimes, R., Fuentes Hernández, L. M., Cossio Vargas, L. E., Jaime Gustavo, L. A., & Sánchez Lucio, R. (2011) *Enfermedades fungosas y bacterianas del cultivo de tomate en el estado de Nayarit*. Santiago Ixcuintla.
- González-Rey, G., & Falcón Anaya, C. (2015). Procedimiento para el análisis de repetibilidad y reproducibilidad en procesos de manufactura. *Revista Cubana de Ingeniería*, 6(3), 53–59.
- Guarino, L., Ramanatha Rao, V., & Reid, R. S. (1995). *Collecting plant genetic diversity: technical guidelines*.
- Hanson, P., Lu, S. F., Wang, J. F., Chen, W., Kenyon, L., Tan, C. W., ... & Ledesma, D. (2016). Conventional and molecular marker-assisted selection and pyramiding of genes for multiple disease resistance in tomato. *Scientia Horticulturae*, 201, 346-354.
- Herregods, M. (1998, August). Postharvest market quality preferences for fruit and vegetables. In XXV International Horticultural Congress, Part 8: Quality of Horticultural Products 518 (pp. 207-212).
- Huei-Mei Chen, Chen-Yu Lin, Miho Yoshida, Peter Hanson and Roland Schafleitner, (2015). Multiplex PCR for Detection of *Tomato yellow leaf curl disease* and Root-Knot Nematode Resistance Genes in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *International Journal of Plant Breeding and Genetics*, 9: 44-56.
- International Standardization Organization (ISO) 2003. Microbiology of food and animal feedings stuffs – Protocol for the validación of alternative methods (ISO 16140: 2003). International Organization for Standardization, Geneva.
- Jenkins, J. A. (1948). The origin of the cultivated tomato. *Economic Botany*, 2(4), 379-392.
- Knudsen, H. (2000). *Directorio de Colecciones de Germoplasma en América Latina y el Caribe* (Primera ed). Roma, Italia. Colectar las razas nativas más antiguas, con el fin de conservar el patrimonio nacional biocultural.
- Knudsen, H. (2000). *Directorio de Colecciones de Germoplasma en América Latina y el Caribe* (Primera ed). Roma, Italia. Colectar las razas nativas más antiguas, con el fin de conservar el patrimonio nacional biocultural.
- Lafrance, R., Valdez-Torres, J. B., Villicaña, C., García-Estrada, R. S., Esparza-Araiza, M. J., & León-Félix, J. (2023). Response Surface Methodology for Optimization of Multiplex-PCR Protocols for Detection of TYLCV, TSWV and *Fol* Molecular Markers: Analytical Performance Evaluation. *Genes*, 14(2), 337.
- Lafrance, R., Villicaña, C., Valdéz-Torres, J.B., Martínez-Montoya, H., Castillo-Ruiz, O., Alemán-Castillo, S.E., Esparza-Araiza, M.J., León-Félix, J., (2021). Optimization of PCR-based TYLCV molecular markers by response surface methodology. *Gene* 785. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.145606>
- Langella, R., Ercolano, M. R., Monti, L. M., Frusciante, L., & Barone, A. (2004). Molecular marker

assisted transfer of resistance to TSWV in tomato elite lines. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 79(5), 806-810.

- Liu, C.Q., J.F. Li, X.Y. Xu and J.B. Jiang, 2013. Study on identification of Ty-1 gene, Ty-2 gene, Mi gene and Cf-5 gene by quadruple PCR in tomato. *Northern Hortic.*, 9: 119-123.
- Lobato Ortiz, R., Rodríguez Guzmán, E., Carrillo Rodríguez, J. C., Chávez Servia, J. L., Sánchez Peña, P., & Aguilar Meléndez, A. (2012). *Exploración , colecta y conservación de recursos genéticos de jitomate : avances en la Red de Jitomate* (Primera ed). Texcoco, México. Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (SINAREFI), Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación y Colegio de Postgraduados.
- Lorenz, T.C., (2012). Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J. Visual. Exper.* 63, e3998 <https://doi.org/10.3791/3998>
- Lugo-Melchor, O.Y.; Guzmán-Urriarte, R.; García-Estrada, R.S.; León-Félix, J.; Josefina, L.F. Geminivirus Transmitidos por Mosca Blanca (*Bemisia Tabaci*) en Tomate, en el Valle Agrícola de Culiacán, Sinaloa. *Rev. Mex. Fitopatol.* 2011, 29, 109–118.
- Lukyanenko, A. N. (1991). *Disease resistance in tomato. In Genetic improvement of tomato* (pp. 99-119). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Nowicki M, Kozik EU, Foolad MR (2013). *Late blight of tomato. Translational genomics for crop breeding*, volume I: biotic stress. 1st edn. Varshney RK, Tuberosa R (eds) Wiley, Hoboken.
- Pan, P., Jin, W., Li, X., Chen, Y., Jiang, J., Wan, H., Yu, D., (2018). Optimization of multiplex quantitative polymerase chain reaction based on response surface methodology and an artificial neural network-genetic algorithm approach. *PLoS One* 13, e0200962.
- Parlevliet, J. E., & Zadoks, J. C. (1977). The integrated concept of disease resistance: a new view including horizontal and vertical resistance in plants. *Euphytica*, 26, 5-21.
- Peralta, I., Spooner, D.M. and Knapp, S. (2008) Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sections *lycopersicoides*, *Juglandilolia*, *Lycopersicon*; Solanaceae). *Syst. Bot. Monogr.* 84,1–186
- Ramos, A., Sánchez, P., Ferrer, J. M., Barquín, J., & Linares, P. (2010). Modelos Matemáticos de Optimización. Universidad Pontificia: Madrid.
- Rick, C. M. (1978). The tomato. *Scientific American*, 239(2), 76-89.
- Sánchez-Peña, P., Oyama, K., Núnéz-Farfán, J., Fornoni, J., Hernández-Verdugo, S., Márquez-Guzmán, J., & Garzón-Tiznado, J. A. (2006). Sources of resistance to whitefly (*Bemisia* spp.) in wild populations of *Solanum lycopersicum* var . *cerasiforme* (Dunal) spooner G . J . Anderson et R . K . Jansen in Northwestern Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53, 711–719. <https://doi.org/10.1007/s10722-004-3943-9>
- Shao-peng, W., Shang-wu, L., Yong, L., Wei-ting, L., & Dian-qiu, L. (2012). Multiplex PCR system optimization with potato SSR markers. *Journal of Northeast Agricultural University (English Edition)*, 19(3), 20-27.
- SIAP. (2020). Atlas-agroalimentario. Recuperado de https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2020/Atlas-Agroalimentario-2020. Última fecha de consulta: 01/04/2021.

- Singh Boparai, K., Singh, R., & Singh, H. (2016). Modeling and optimization of extrusion process parameters for the development of Nylon6 – Al – Al 2 O 3 alternative FDM filament Inspection and Testing. *Progress in Additive Manufacturing*, 1(1), 115–128.
- Singh, V. K., Singh, A. K., & Kumar, A. (2017). Disease management of tomato through PGPB: current trends and future perspective. *Biotech*, 7(4), 255.
- Tanksley, S.D. and McCouch, S.R. (1997) Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science*, 277, 1063–1066.
- USDA, N. (2023). United States department of agriculture. Plants Database. <http://plants.usda.gov> (accessed in 2024).
- Van der Does, H. C., Constantin, M. E., Houterman, P. M., Takken, F. L. W., Cornelissen, B. J. C., Haring, M. A., ... & Rep, M. (2019). *Fusarium oxysporum* colonizes the stem of resistant tomato plants, the extent varying with the R-gene present. *European Journal of Plant Pathology*, 154, 55-65.
- Van Der Plank, J. E. (1966). Horizontal (polygenic) and vertical (oligogenic) resistance against blight. *American Potato Journal*, 43, 43-52.
- Velázquez Alejos, L. P., Aragón Martínez, M. del C., & Amelia Cornejo, R. (2010). Extracción y purificación de ADN. 1–26.
- Vidavski, F., H. Czosnek, S. Gazit, D. Levy and M. Lapidot, (2008). Pyramiding of genes conferring resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* from different wild tomato species. *Plant Breed.*, 127: 625-631.

6. CONCLUSIONES GENERALES

En este trabajo de investigación desarrollamos métodos de selección de nuevos cultivares de tomate resistentes a patógenos (TYLCV, TSWV y *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*) asistido de marcadores moleculares y ensayos fenotípicos.

Llegamos a la conclusión de que la optimización mediante la metodología de superficie respuesta representa un método ventajoso en la biología molecular, sobre todo para la detección conjunta de estos marcadores moleculares permitiendo obtener un buen rendimiento analítico utilizando pocas combinaciones de las variables que influyen realmente en la PCR multiplex.

Este estudio también mostró que independientemente de la cantidad de genes resistentes presentes en los híbridos, la calidad de los frutos de tomate producidos por ellos no está afectada. Por lo que, la presencia de estos genes no impide que los frutos de estos híbridos cumplieran con las normas de Estados Unidos y México para ser vendidos al consumidor.

A comparación del resto, dos de estos híbridos HT90-13 y HT132 tienen muy baja incidencia de *Fol* raza 3.