

## Molecular markers of pathogen resistance for assisted breeding of tomato (*Solanum lycopersicum* L.)

### Marcadores moleculares de resistencia a patógenos para el mejoramiento asistido de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

Placido Facundo-Angel; Jaime Sahagún-Castellanos\*;  
Juan Enrique Rodríguez-Pérez; Santos Gerardo Leyva-Mir

Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco km 38.5, Chapingo, Estado de México, C. P. 56230, MÉXICO.

\*Corresponding author: jsahagunc@yahoo.com.mx

#### Abstract

Tomato is infected by more than 100 pathogens that affect its production; therefore, it is crucial that commercial varieties integrate resistance genes. In this context, molecular markers improve the efficiency of the selection process. This study aimed to validate the efficacy of molecular markers in identifying genes resistant to six pathogens: *Meloidogyne* sp. (Mi-1 and Mi-1.2), *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (I-1 and I-2), *Stemphyllium* sp. (Sm), *Phytophthora infestans* (Ph3), tomato yellow leaf curl virus (Ty-2 and Ty-3) and spotted wilt virus (Sw5b). Protocols for 10 pairs of markers associated with resistance genes were adapted and tested on 20 genotypes. Pathogen resistance genes were identified in 17 advanced lines and three commercial hybrids of tomato. Molecular markers distinguished lines with resistance genes to six important diseases in tomato cultivation, which could therefore be used for the development of new varieties.

**Keywords:** genetic resistance, assisted selection, SCAR markers, phytopathogens, gene identification.

#### Resumen

El tomate se enfrenta a más de 100 patógenos que afectan su producción; por ello, es crucial que las variedades comerciales integren genes de resistencia. En este contexto, los marcadores moleculares mejoran la eficiencia del proceso de selección. El objetivo de este estudio fue validar la eficacia de marcadores moleculares para identificar genes de resistencia de seis patógenos: *Meloidogyne* sp. (Mi-1 y Mi-1.2), *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (I-1 y I-2), *Stemphyllium* sp. (Sm), *Phytophthora infestans* (Ph3), virus del rizado amarillo del tomate (Ty-2 y Ty-3) y virus de la marchitez manchada (Sw5b). Se adaptaron los protocolos de 10 pares de marcadores asociados a los genes de resistencia y se probaron en 20 genotipos. Se identificaron genes de resistencia a patógenos en 17 líneas avanzadas y tres híbridos comerciales de tomate. Los marcadores moleculares distinguieron líneas con genes de resistencia a seis enfermedades importantes en el cultivo de tomate, por lo cual se podrían utilizar para el desarrollo de nuevas variedades.

**Palabras clave:** resistencia genética, selección asistida, marcadores SCAR, fitopatógenos, identificación de genes.



## Introduction

Tomato cultivation is confronted by more than 100 pathogens that economically impact its production, among which are bacteria, fungi, oomycetes, viruses and nematodes. Among the most common diseases in Mexico are damping off (*Pythium* sp., *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora* sp., *Fusarium* sp.), wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Verticillium dahliae*, *V. Alboatrum*), gray mold (*Botryotinia fuckeliana*), late blight (*Phytophthora infestans*), early blight (*Alternaria tomatophila*, *Alternaria alternata*), powdery mildew (*Leveillula taurica*), leaf mold (*Cladosporium fulvum*), bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*), and bacterial speck (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) (Alvarado-Rodríguez et al., 2011).

Symptoms of the aforementioned diseases range from wilting and stunting to yellowish discoloration and death of tissues and organs. These effects translate into low yields, lower fruit quality and shorter shelf life (Olivier et al., 2018). Losses in tomato yield and marketable value caused by viruses (tomato yellow leaf curl virus [TYLCV] and tomato spotted wilt virus [TSWV]) range from 40 to 100 % when plant damage is severe (Hanson et al., 2016), and those caused by fungi such as *Fusarium* can be up to 70 % under favorable environmental conditions (27-30 °C) (Panno et al., 2021).

The impact of disease incidence on yield can be 1- 5 % in areas with mild onset, and more than 30 % in areas with severe onset (Liu & Wang, 2020). This leads to the need to breed varieties capable of resisting high-impact diseases by incorporating genes and promoting diversity in varieties to reduce the impact of pathogens (Bailey-Serres et al., 2019).

In most commercial tomato varieties, disease resistance is determined by individual major effect genes, each conferring resistance to a specific pathogen, race, strain or phylotype (Scott, 2005). Genes resistant to more than 35 pathogens, commonly used by the seed industry for incorporation into new commercial tomato varieties, have been discovered and mapped. Among these genes are those resistant to wilt caused by *Fusarium* sp. (races 1, 2 and 3), late blight (*Ph-3* and *Ph-2*), wilt caused by *Verticillium* sp. (race 1), bacterial speck (*Rx3* and *Rx4*), TYLCV (*Ty-1*, *Ty-2*, *Ty-3* and *Ty-4*) and root-knot nematode (*Mi-1*) (Foolad & Panthee, 2012).

Most of the markers used to identify resistance genes correspond to the cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) and sequence characterized amplified region (SCAR) types, which are based on the polymerase chain reaction (PCR) technique (Lee et al., 2015; Oladokun & Mugisa, 2019). SCAR markers allow omitting the use of restriction enzymes, which eliminates a step after the PCR reaction; therefore, they

## Introducción

El cultivo del tomate se enfrenta a más de 100 patógenos que impactan económicamente su producción, entre los cuales se encuentran bacterias, hongos, oomicetos, virus y nematodos. Entre las enfermedades más comunes en México se encuentran el Damping off (*Pythium* sp., *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora* sp., *Fusarium* sp.), la marchitez (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Verticillium dahliae*, *V. Alboatrum*), el moho gris (*Botryotinia fuckeliana*), el tizón tardío (*Phytophthora infestans*), el tizón temprano (*Alternaria tomatophila*, *Alternaria alternata*), la cenicilla polvorienta (*Leveillula taurica*), el moho de las hojas (*Cladosporium fulvum*), el cáncer bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*), la peca y la mancha bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) (Alvarado-Rodríguez et al., 2011).

Los síntomas de las enfermedades mencionadas van desde marchitamiento y retraso del crecimiento, hasta la decoloración amarillenta y muerte de tejidos y órganos. Estos efectos se traducen en rendimientos bajos, calidad inferior de fruto y menor vida de anaquel (Olivier et al., 2018). Las pérdidas en el rendimiento y valor comercializable de tomate causadas por virus (virus del rizado amarillo del tomate [TYLCV] y virus de la marchitez manchada [TSWV]) van del 40 al 100 % cuando el daño en las plantas es severo (Hanson et al., 2016), y las causadas por hongos como *Fusarium* pueden ser de hasta 70 % en condiciones ambientales favorables (27-30 °C) (Panno et al., 2021).

El impacto de la incidencia de enfermedades en el rendimiento puede ser de 1 a 5 % en áreas con un inicio leve, y más de 30 % en áreas con un inicio severo (Liu & Wang, 2020). Esto lleva a la necesidad de obtener variedades capaces de resistir enfermedades de alto impacto mediante la incorporación de genes y promover la diversidad en las variedades para reducir el impacto de los patógenos (Bailey-Serres et al., 2019).

En la mayoría de las variedades comerciales de tomate, la resistencia a las enfermedades está determinada por genes individuales de efectos mayores, y cada uno confiere resistencia a un patógeno específico, raza, cepa o filotipo (Scott, 2005). Se han descubierto y mapeado genes de resistencia a más de 35 patógenos, comúnmente usados por la industria de semillas para su incorporación a las nuevas variedades comerciales de tomate. Entre estos genes se encuentran los resistentes al marchitamiento por *Fusarium* sp. (razas 1, 2 y 3), al tizón tardío (*Ph-3* y *Ph-2*), al marchitamiento por *Verticillium* sp. (raza 1), a la mancha bacteriana (*Rx3* y *Rx4*), al TYLCV (*Ty-1*, *Ty-2*, *Ty-3* y *Ty-4*) y al nematodo que produce nódulos en la raíz (*Mi-1*) (Foolad & Panthee, 2012).

La mayoría de los marcadores empleados para identificar los genes de resistencia corresponden al tipo secuencia

are more efficient and reliable than CAPS markers in gel-based detection (Zhang & Panthee, 2021). They are also highly reproducible, have a medium-level technical requirement and require only low-quality target DNA (Agarwal et al., 2008). PCR-based techniques require less DNA, need less time and are less expensive than hybridization-based techniques; moreover, they are reproducible, easy to use and amenable to automation (Jiang, 2013).

In traditional breeding, distinctive phenotypic traits are selected during segregation, requiring eight to ten years to generate a new variety. Marker-assisted selection (MAS) is an innovative approach that improves the selection process by identifying phenotypic traits early through genotyping, replacing some phenotypic evaluations (Alvarez-Gil, 2011). Because *in vivo* assays can be influenced by environmental factors (Arens et al., 2010; Abewoy-Fentik, 2017), MAS, by eliminating environmental interaction, increases selection precision and efficiency, reduces costs and shortens selection cycles. In addition, this technique is invaluable when pathogenic tests are complex or unreliable, or there is a risk of introduction of exotic pathogens (Foolad et al., 2008).

Tomato breeding has resulted in the introduction of numerous genes for disease resistance, agronomic traits and fruit quality, which come from various related wild species (Álvarez-Gil, 2011). Traits have acquired a crucial role in the testing of distinctness, uniformity and stability in applications for plant breeders' rights. Considering the above, this study aimed to evaluate and validate the efficacy of molecular markers, using controlled PCR conditions, to identify genes resistant to six economically important diseases in advanced tomato lines.

## Materials and methods

### Plant material and research site

Sixteen tomato (*Solanum lycopersicum* L.) lines from the Universidad Autónoma Chapingo (UACH) "Breeding Project", the commercial variety Mermaid and three commercial hybrids from the HM.CLAUS® company were used. The hybrids were used as controls to identify resistance genes.

The research was carried out in the UACH Plant Science Department's Molecular Markers laboratory. The seeds were established in a greenhouse in 200-cavity trays with peat moss as substrate. Fifteen days after plant emergence, healthy fresh tissue, without apparent physical damage, was harvested and subsequently processed in the laboratory.

polimórfica amplificada y digerida (CAPS, por sus siglas en inglés) y región amplificada caracterizada por secuencia (SCAR, por sus siglas en inglés), los cuales se basan en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) (Lee et al., 2015; Oladokun & Mugisa, 2019). Los marcadores SCAR permiten omitir el uso de enzimas de restricción, lo cual elimina un paso después de la reacción de PCR; por lo tanto, son más eficientes y confiables que los marcadores CAPS en la detección basada en geles (Zhang & Panthee, 2021). Asimismo, son altamente reproducibles, presentan un requerimiento técnico medio y requieren baja calidad del ADN objetivo (Agarwal et al., 2008). Las técnicas basadas en PCR requieren menos ADN, menos tiempo y son menos costosas que las técnicas basadas en hibridación; además, son reproducibles, fáciles de usar y susceptibles de automatización (Jiang, 2013).

En el mejoramiento genético tradicional se seleccionan caracteres fenotípicos distintivos durante la segregación, por lo cual se requieren de ocho a diez años para generar una nueva variedad. La selección asistida por marcadores (MAS, por sus siglas en inglés) es un enfoque innovador que mejora el proceso de la selección al identificar de manera temprana caracteres fenotípicos a través del genotipo, sustituyendo a algunas evaluaciones fenotípicas (Álvarez-Gil, 2011). Debido a que los ensayos *in vivo* pueden ser influenciados por factores ambientales (Arens et al., 2010; Abewoy-Fentik, 2017), la MAS, al eliminar la interacción ambiental, incrementa la precisión y eficiencia de la selección, reduce costos y acorta los ciclos de selección. Además, esta técnica es invaluable cuando las pruebas patogénicas son complejas o poco confiables, o existe riesgo de introducción de patógenos exóticos (Foolad et al., 2008).

El mejoramiento del tomate ha derivado en la introducción de numerosos genes de resistencia a enfermedades, caracteres agronómicos y calidad de fruto, los cuales provienen de diversas especies silvestres emparentadas (Álvarez-Gil, 2011). Los caracteres han adquirido un papel crucial en las pruebas de distinción, uniformidad y estabilidad en solicitudes de derechos de obtentor. Considerando lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar y validar la eficacia de marcadores moleculares, mediante condiciones de PCR controladas, para identificar genes de resistencia a seis enfermedades de importancia económica en líneas avanzadas de tomate.

## Materiales y métodos

### Material vegetal y sitio de investigación

Se utilizaron 16 líneas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) provenientes del "Proyecto de Mejoramiento Genético" de la Universidad Autónoma Chapingo, la variedad

Molecular markers

The SCAR markers used were chosen from published scientific reports (Table 1). These markers are related to 10 genes with resistance to six tomato diseases; some are linked to the gene and others directly identify the resistance gene. The tomato diseases associated with the markers studied were: *Meloidogyne* spp. (TO\_MI1 and TO\_MI23; *Mi-1* and *Mi-1.2*), *Fusarium oxysporum* f. sp.

comercial Mermaid y tres híbridos comerciales de la empresa HM.CLAUS®. Estos últimos utilizados como controles para identificar los genes de resistencia.

La investigación se realizó en el laboratorio de Marcadores Moleculares del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo. Las semillas se establecieron en invernadero, en charolas de 200 cavidades con turba como sustrato. Quince días

Table 1. Molecular markers for disease resistance genes considered efficient in tomato lines.  
Cuadro 1. Marcadores moleculares para genes de resistencia a enfermedades considerados como eficientes en líneas de tomate.

| Pathogen/<br>Patógeno                        | R Gene<br>(chromosome)/<br>Gen R<br>(cromosoma) | SCAR marker/Sequence 5' - 3' /<br>Marcador SCAR/Secuencia 5' - 3'   | Fragment size (bp)/<br>Tamaño del<br>fragmento (pb) | Reference/<br>Referencia  |
|--|---|---|---|---|
| <i>Meloidogyne</i> sp.                       | <i>Mi-1</i> (C6)                                | Pmi3 (gene-based/basado en el gen)<br>F: GGTATGAGCATGCTTAATCAGAGCTCTC<br>R: CCTACAAGAAATTATTGTGCGTGTGAATG | R: 550<br>S: 350                                    | El Mehrach et al. (2005)  |
| <i>Meloidogyne</i> sp.                       | <i>Mi-1.2</i> (C6)                              | Mi23 (gene-based/basado en el gen)<br>F: TGGAAAAATGTTGAATTTCTTTTG<br>R: GCATACTATATGGCTTGTTACCC           | R: 380<br>S: 430                                    | Seah et al. (2004)  |
| <i>Fusarium oxysporum</i><br>race / raza 1   | <i>I-1</i> (C11)                                | At2 (gene-based/ligado al gen)<br>F: CGAATCTGTATATTACATCCGTCGT<br>R: GGTGAATACCGATCATAGTCGAG              | R: 130<br>S: 90                                     | Ori et al. (1997),<br>Scott et al. (2004),<br>Arens et al. (2010) |
| <i>Fusarium oxysporum</i><br>race 1 / raza 2 | <i>I-2</i> (C11)                                | Z1063 (gene-based/ligado al gen)<br>F: ATTTGAAAGCGTGATTTGC<br>R: CTTAACTCACCATTAAATC                      | R: 940<br>S: 1380                                   | Arens et al. (2010)   |
| <i>Stemphyllium solani</i>                   | <i>Sm</i> (C11)                                 | D5 (gene-based/basado en el gen)<br>F: CCCGTGGCACTACAACCTCTT<br>R: TCTGCTTTCGCTCTGCTTGA                   | R: 876<br>S: 820                                    | Yang et al. (2017a)   |
| <i>Phytophthora infestans</i>                | <i>Ph3</i> (C9)                                 | Ph3 (gene-based/basado en el gen)<br>F: CTACTCGTGCAAGAAGGTAC<br>R: TCCACATCACCTGCCAGITG                   | R: 176<br>S: 154                                    | Jung et al. (2015)  |
| TYLCV  | <i>Ty-2</i> (C11)                               | TG0302 (gene-based/basado en el gen)<br>F: TGGCTCATCCTGAAGCTGATAGCGC<br>R: TCCACATCACCTGCCAGITG           | R: 940<br>S: 800                                    | Yang et al. (2014)  |
| TYLCV  | <i>Ty-3</i> (C6)                                | P6-25 (gene-based/ligado al gen)<br>F: GGTAGTGGAATGATGCTGCTC<br>R: GCTCTGCCTATTGTCCCATATAAACC             | R: 630<br>S: 320                                    | Ji et al. (2007)  |
| TSWV   | <i>Sw5b</i> (C9)                                | Sw5b (gene-based/basado en el gen)<br>F: CGGAACCTGTAACTTGACTG<br>R: GAGCTCTCATCCATTTTCCG                  | R: 541<br>S: NBP                                    | Shi et al. (2011)   |
| TSWV   | <i>Sw5b</i> (C9)                                | Sw-5-2 (gene-based/basado en el gen)<br>F: AATTAGGTTCTTGAAGCCCATCT<br>R: TTCCGCATCAGCCAATAGTGT            | R: 574<br>S: 510, 464                               | Dianese et al. (2010)   |

TYLCV = tomato yellow leaf curl virus; TSWV = tomato spotted wilt virus; R = resistant; S = susceptible; NBP = no band presented for this marker.  
TYLCV = virus del rizado amarillo del tomate; TSWV = virus de la marchitez manchada; R = resistente; S = susceptible; NBP = no presentan banda para este marcador.



*lycopersici* (TO\_I1 and TO\_I2; I-1 and I-2), *Stemphyllium* sp. (TO\_SM; Sm), *Phytophthora infestans* (TO\_PH3; Ph3), TYLCV (TO\_Y2 and TO\_Y3; Ty-2 and Ty-3) and TSWV (TO\_SWS; Sw5b) (Table 1).

### DNA extraction

Total DNA was extracted from 0.6 g of fresh leaves from 15-day-old seedlings of the considered lines using the CTAB (cetyl-trimethyl-ammonium bromide) extraction method (Doyle & Doyle, 1987). The extracted DNA was adjusted to a concentration of 10 ng·μL<sup>-1</sup>. A 25 μL reaction mixture was used, which included 4.7 μL of H<sub>2</sub>O, 10 μL of dNTPS (200 μM), 2.5 μL of buffer (1x), 3 μL of MgCl<sub>2</sub> (3 mM), 1 μL of each primer (Forward and Reverse) (10 pmol·μL<sup>-1</sup>), 0.3 μL of Taq Polymerase (1.5 u·μL<sup>-1</sup>) and 2.5 μL of DNA (10 ng·μL<sup>-1</sup>). PCR conditions were: initial denaturation at 93 °C for 1 min, 40 cycles of 20 s at 93 °C, 1 min at the primer annealing temperature and 20 s at 72 °C each, and a final extension of 6 min at 72 °C. After cooling to 10 °C, PCR products were separated by electrophoresis on a 2 % agarose gel with 1x TAE buffer and stained with ethidium bromide. Visualization was performed under UV light with a photodocumenter (DigiDoc-It, UVP®, USA). Annealing temperatures used for the primers were: 1) 60 °C for the markers Pmi3, Mi23, Ph3, TG0302, P6-25, 2) 64 °C for Sw5b, At2 and D5, 3) 55 °C for Sw-5-2 and 4) 56 °C for Z1063.

### Analysis of markers and amplification products

Those markers that produced clear bands and loci-specific PCR products were considered useful, whereas abnormal PCR products were discarded and not included in the final analysis. Amplicon size and other marker characteristics were obtained from other research work (Table 1). The presence of resistance alleles was confirmed using commercial hybrids (Moctezuma, El Cid and Mesias) from the company HM.Clause® México as controls, since they present alleles of declared resistance to pathogens such as *Meloidogyne* sp., *Fusarium* (race 1, 2 and 3), TYLCV and TSWV.

## Results and discussion

### Molecular markers for root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.)

Using the Pmi3F/R primers (El Mehrach et al., 2005), for the *Mi-1* gene, different genotypes were identified: six susceptible homozygotes (mi/mi) with a 350 bp band, eight resistant homozygotes (Mi/Mi) with a 550 bp band (including the commercial hybrid Moctezuma) and one heterozygous genotype (Mi/mi) with both bands (Cid) (Figure 1a). Mehrach et al. (2005) also examined the use

después de la emergencia de las plantas, se cosechó tejido fresco sano, sin daño físico aparente, que posteriormente se procesó en el laboratorio.

### Marcadores moleculares

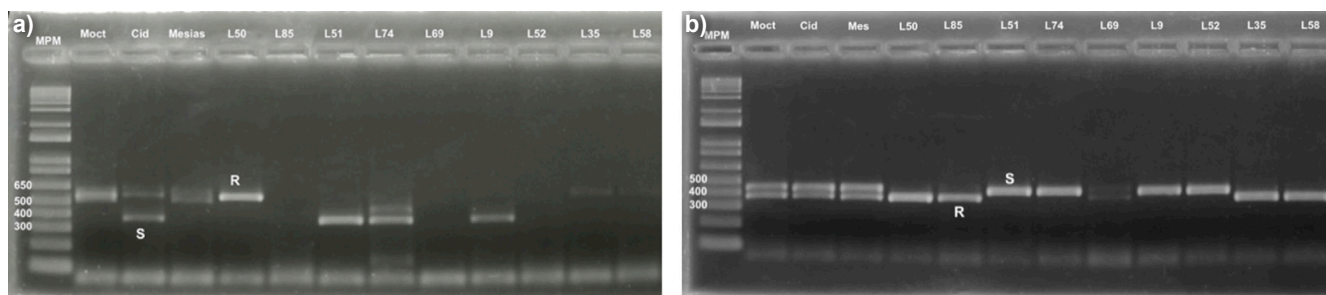
Los marcadores SCAR utilizados se eligieron de reportes científicos publicados (Cuadro 1). Estos marcadores están relacionados con 10 genes de resistencia a seis enfermedades del tomate; algunos están ligados con el gen y otros identifican directamente al gen de resistencia. Las enfermedades del tomate asociadas a los marcadores estudiados fueron: *Meloidogyne* spp. (TO\_MI1 y TO\_MI23; Mi-1 y Mi-1.2), *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (TO\_I1 y TO\_I2; I-1 y I-2), *Stemphyllium* sp. (TO\_SM; Sm), *Phytophthora infestans* (TO\_PH3; Ph3), TYLCV (TO\_Y2 y TO\_Y3; Ty-2 y Ty-3) y TSWV (TO\_SWS; Sw5b) (Cuadro 1).

### Extracción de ADN

Se extrajo ADN total de 0.6 g de hojas frescas de las plántulas de 15 días de edad de las líneas consideradas a partir del método de extracción CTAB (bromuro de cetil-trimetil amonio) (Doyle & Doyle, 1987). El ADN extraído se ajustó a una concentración de 10 ng·μL<sup>-1</sup>. Se utilizó una mezcla de reacción de 25 μL, la cual incluyó 4.7 μL de H<sub>2</sub>O, 10 μL de dNTPS (200 μM), 2.5 μL de amortiguador (1x), 3 μL de MgCl<sub>2</sub> (3 mM), 1 μL de cada iniciador (*Forward* y *Reverse*) (10 pmol·μL<sup>-1</sup>), 0.3 μL de Taq Polimerasa (1.5 u·μL<sup>-1</sup>) y 2.5 μL de ADN (10 ng·μL<sup>-1</sup>). Las condiciones de la PCR fueron: desnaturalización inicial a 93 °C durante 1 min, 40 ciclos de 20 s a 93 °C, 1 min a la temperatura de alineación de los iniciadores y 20 s a 72 °C cada uno, y una extensión final de 6 min a 72 °C. Después de enfriarse a 10 °C, los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2 % con amortiguador TAE 1x y se tiñeron con bromuro de etidio. La visualización se realizó bajo luz UV con un fotodocumentador (DigiDoc-It, UVP®, EUA). Las temperaturas de alineamiento utilizadas para los iniciadores fueron: 1) 60 °C para los marcadores Pmi3, Mi23, Ph3, TG0302, P6-25, 2) 64 °C para Sw5b, At2 y D5, 3) 55 °C para Sw-5-2 y 4) 56 °C para Z1063.

### Análisis de marcadores y productos de amplificación

Se consideraron como marcadores útiles aquellos que produjeron bandas claras y productos de PCR de loci específicos, mientras que los productos de PCR anómalos fueron descartados y no incluidos en el análisis final. El tamaño del amplicón y otras características de los marcadores se obtuvieron de otros trabajos de investigación (Cuadro 1). La presencia de alelos de resistencia se confirmó utilizando como controles a híbridos comerciales (Moctezuma, El Cid y Mesias) de la



**Figure 1. Amplification products of the marker test for *Meloidogyne* sp. resistance genes: a) Pim3 marker for the *Mi-1* gene and b) Mi23 marker for the *Mi-1.2* gene.**

**Figura 1. Productos de amplificación de la prueba de marcadores para genes de resistencia a *Meloidogyne* sp.: a) marcador Pim3 para el gen *Mi-1* y b) marcador Mi23 para el gen *Mi-1.2*.**

of Pmi3 and identified heterozygous and homozygous genotypes resistant and susceptible to *Meloidogyne*.

The Mi23F/R primer pair (Seah et al., 2004) was used to detect the presence of the *Mi-1.2* gene and eight homozygous resistant genotypes (Mi/Mi) characterized by a 380 bp band with potential for resistance transfer were identified (Figure 1b). Likewise, eight susceptible homozygous genotypes (mi/mi) with a 430 bp band and three heterozygous genotypes (Mi/mi) with both bands were found, including three commercial hybrids. Seah et al. (2004) evaluated the Mi23F/R markers and allowed them to discriminate lines resistant and susceptible to *Meloidogyne* in heterozygous and homozygous states.

The bands of the Pmi3F/R and Mi23F/R markers, linked to the *Mi-1* and *Mi-1.2* genes, respectively, showed different identification patterns in three genotypes. These genotypes exhibited a single 550 bp resistance band with the Pmi3F/R markers, whereas the Mi23F/R markers identified them as heterozygous, which could indicate that these genes, although homologous, are not identical (El Mehrach et al., 2005). These genes encode proteins consisting of a nucleotide binding site and a leucine-rich region (CC-NBS-LRR), and provide effective protection against *Meloidogyne* species (Milligan et al., 1998; Devran et al., 2023). The *Meloidogyne* resistance gene *Mi-1* was determined to be linked to several genes, including the homozygous gene *Ty-1* in repulsion phase, which is linked to undesirable genes (Carbonell et al., 2018).

## Molecular markers for fungi

### Tomato vascular wilt

(*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)

For the *Fusarium oxysporum* race 1 resistance gene, the At2F/R markers were used (Ori et al., 1997; Scott et al., 2004; Arens et al., 2010). Sixteen lines were found with

empresa HM.Clause® México, ya que presentan alelos de resistencia declarada a patógenos como *Meloidogyne* sp., *Fusarium* (raza 1, 2 y 3), TYLCV y TSWV.

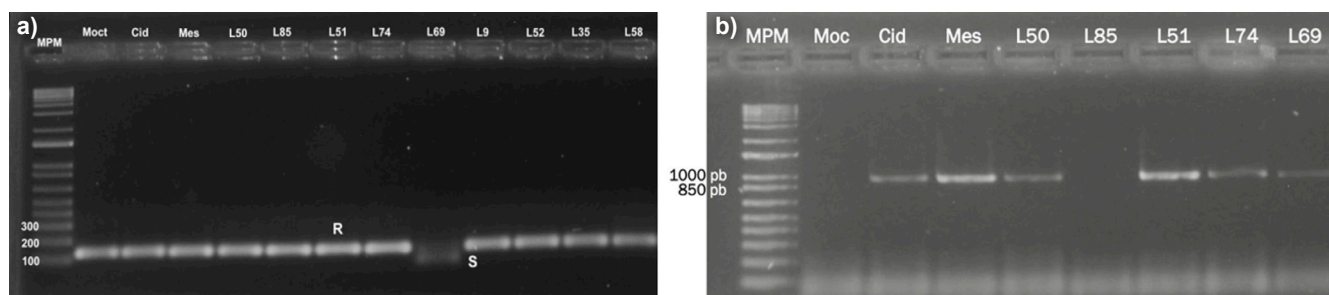
## Resultados y discusión

### Marcadores moleculares para nematodos de la raíz (*Meloidogyne* spp.)

A partir de los iniciadores Pmi3F/R (El Mehrach et al., 2005), para el gen *Mi-1*, se identificaron distintos genotipos: seis homocigotos susceptibles (mi/mi) con una banda de 350 pb, ocho homocigotos resistentes (Mi/Mi) con una banda de 550 pb (incluyendo el híbrido comercial Moctezuma) y un genotipo heterocigoto (Mi/mi) con ambas bandas (Cid) (Figura 1a). El Mehrach et al. (2005) también examinaron el uso de Pmi3 e identificaron genotipos heterocigotos y homocigotos resistentes y susceptibles a *Meloidogyne*.

El par de iniciadores Mi23F/R (Seah et al., 2004) se utilizó para detectar la presencia del gen *Mi-1.2* y se identificaron ocho genotipos homocigóticos resistentes (Mi/Mi) caracterizados por una banda de 380 pb, con potencial para la transferencia de resistencia (Figura 1b). Asimismo, se encontraron ocho genotipos homocigóticos susceptibles (mi/mi) con una banda de 430 pb y tres genotipos heterocigóticos (Mi/mi) con ambas bandas, incluyendo tres híbridos comerciales. Seah et al. (2004) evaluaron los marcadores Mi23F/R y les permitió discriminar líneas resistentes y susceptibles a *Meloidogyne* en estados heterocigóticos y homocigóticos.

Las bandas de los marcadores Pmi3F/R y Mi23F/R, vinculados a los genes *Mi-1* y *Mi-1.2*, respectivamente, mostraron patrones de identificación diferentes en tres genotipos. Estos genotipos exhibieron una única banda de resistencia de 550 pb con los marcadores Pmi3F/R, mientras que los marcadores Mi23F/R los identificaron como heterocigóticos, lo cual podría indicar que estos



**Figure 2. Amplification products of the marker test for *Fusarium* resistance genes race 1 and 2: a) At2 marker for the *I-1* gene and b) Z1063 marker for the *I-2* gene.**

**Figura 2. Productos de amplificación de la prueba de marcadores para genes de resistencia a *Fusarium* raza 1 y 2: a) marcador At2 para el gen *I-1* y b) marcador Z1063 para el gen *I-2*.**

resistance, evidenced by the 130 bp band, and one line that showed both bands (Figure 2a). In turn, resistance genes to *Fusarium oxysporum* race 2 were detected using Z1063F/R markers (Simons et al., 1998; Arens et al., 2010). Eleven lines with resistance were identified, characterized by the 940 bp band, and six lines did not generate a band (Figure 2b). Arens et al. (2010) evaluated 16 primer pairs for the *I-1* gene, and detected a seven-nucleotide deletion in susceptible genotypes; this led to the development of the At2 markers, validated in different laboratories to identify the *I-1* gene. On the other hand, the Z1063 marker only identifies the introduced gene from *S. pimpinellifolium*. Neha et al. (2016) evaluated 18 lines with the markers At2 for *I-1* and Z1063 for *I-2*, and identified 14 lines with the *I-1* gene and one line with the *I-2* gene.

Tomato vascular wilt, caused by *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, causes significant crop losses; therefore, it is crucial to detect the presence of resistance or tolerance genes in commercial varieties. Races 1, 2 and 3 have been recognized as the most detrimental to yield (Sela-Buurlage et al., 2001).

#### Tomato gray spot (*Stemphyllium* sp.)

To identify the *Sm* gene, D5F/R markers were used (Yang et al., 2017a). In 15 lines, the 876 bp resistance band was evident and no 820 bp susceptible lines were found (Figure 3); two lines produced no amplification. Yang et al. (2017b) evaluated the expression of *Sm* resistance genes in F2 segregants, which led to the identification of the D5 marker segregating next to the resistant locus. This makes it possible to distinguish between resistant and susceptible lines. Tomato gray spot, a common foliar disease in warm climates, is caused by *Stemphyllium lycopersici* and resistance to this pathogen is attributed to a single incomplete dominant gene (*Sm*), which confers tolerance to four *Stemphyllium* sp. species (Su et al., 2019).

genes, aunque homólogos, no son idénticos (El Mehrach et al., 2005). Estos genes codifican para proteínas que consisten en un sitio de unión a nucleótidos y una región rica en leucina (CC-NBS-LRR), y proporcionan protección efectiva contra las especies de *Meloidogyne* (Milligan et al., 1998; Devran et al., 2023). Se determinó que el gen de resistencia *Mi-1* a *Meloidogyne* está ligado a varios genes, incluido el gen homocigótico *Ty-1* en fase de repulsión, el cual está vinculado a genes no deseables (Carbonell et al., 2018).

#### Marcadores moleculares para hongos

##### Marchitez vascular del tomate (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)

Para el gen de resistencia a *Fusarium oxysporum* raza 1, se utilizaron los marcadores At2F/R (Ori et al., 1997; Scott et al., 2004; Arens et al., 2010). Se encontraron 16 líneas con resistencia, evidenciada por la banda de 130 pb, y una línea que mostró ambas bandas (Figura 2a). Por su parte, los genes de resistencia a *Fusarium oxysporum* raza 2 se detectaron mediante los marcadores Z1063F/R (Simons et al., 1998; Arens et al., 2010). Se identificaron 11 líneas con resistencia, caracterizadas por la banda de 940 pb, y seis líneas no generaron banda (Figura 2b). Arens et al. (2010) evaluaron 16 pares de iniciadores para el gen *I-1*, y detectaron una delección de siete nucleótidos en genotipos susceptibles; esto llevó al desarrollo de los marcadores At2, validados en distintos laboratorios para identificar el gen *I-1*. Por otro lado, el marcador Z1063 solo identifica el gen introducido de *S. pimpinellifolium*. Neha et al. (2016) evaluaron 18 líneas con los marcadores At2 para *I-1* y Z1063 para *I-2*, e identificaron 14 líneas con el gen *I-1* y una línea con el gen *I-2*.

La marchitez vascular del tomate, causada por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, provoca pérdidas importantes en el cultivo; por tanto, resulta crucial detectar la presencia de genes de resistencia o tolerancia en las



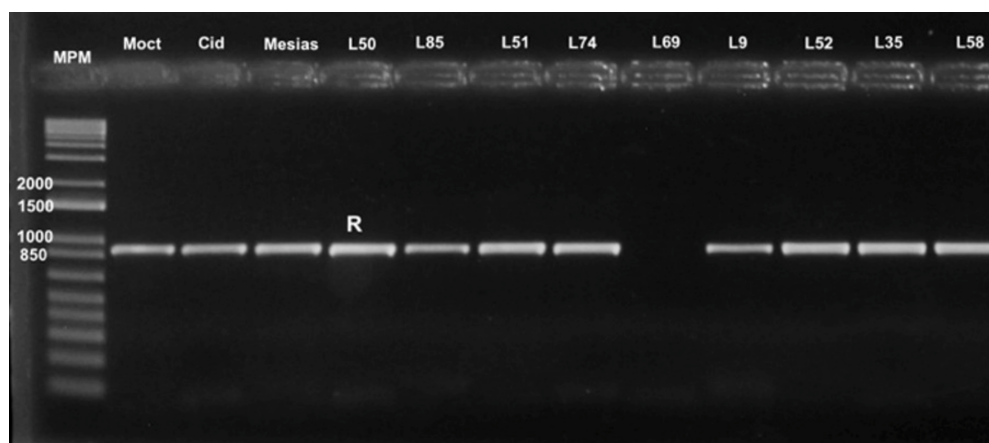


Figure 3. Amplification products of the D5 marker test for the *Sm* resistance gene to *Stemphyllium solani*.

Figura 3. Productos de amplificación de la prueba del marcador D5 para el gene de resistencia *Sm* a *Stemphyllium solani*.

### Molecular markers for oomycetes

#### Late blight (*Phytophthora infestans*)

*Ph3* gene identification was performed with Ph3F/R markers (Jung et al., 2015), and 15 resistant lines were detected with the 176 bp band, but no susceptible lines were found (Figure 4). The presence of multiple resistance or tolerance genes for *P. infestans* improves plant performance against the disease, although their value may be limited due to the lack of durability of resistance to the emergence of new genetic variants of the pathogen (Scott, 2005). Therefore, the use of combinations of these genes is recommended. Considering the impact and rapid spread of this disease, genetic tolerance to *P. infestans* is of great interest in breeding programs; furthermore, it should be considered that the *Ph3* gene confers incomplete dominant resistance (Robbins et al., 2010; Foolad & Panthee, 2012).

### Molecular markers for viruses

#### Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)

Six tolerance genes for TYLCV, an economically important pathogen, have been identified (Verlaan et al., 2013; Wang et al., 2018). Ty-2 gene identification was performed with TG0302F/R markers (Hanson et al., 2016), which generate two bands: one of 940 bp for resistant genotypes and another of 800 bp indicating susceptibility (Table 1; Figure 5a). In no cases were lines identified with the resistance band, but 18 genotypes showed the susceptibility band. Several researchers have used TG0302F/R markers to identify lines with the Ty-2 resistance gene (Lee et al., 2015).

The Ty-3 gene was identified with the P6-25F/R markers (Ji et al., 2007) that generate four bands: one of 320 bp

variedades comerciales. Se han reconocido las razas 1, 2 y 3 como las más perjudiciales para el rendimiento (Sela-Buurlage et al., 2001).

#### Mancha gris del tomate (*Stemphyllium* sp.)

Para identificar el gen *Sm*, se emplearon los marcadores D5F/R (Yang et al., 2017a). En 15 líneas se evidenció la banda de resistencia de 876 pb y no se encontraron líneas susceptibles de 820 pb (Figura 3); dos líneas no produjeron amplificación. Yang et al. (2017b) evaluaron la expresión de los genes de resistencia *Sm* en segregantes F2, lo cual llevó a la identificación del marcador D5 segregado junto al locus resistente. Esto posibilita la distinción entre líneas resistentes y susceptibles. La mancha gris del tomate, enfermedad foliar común en climas cálidos, es causada por *Stemphyllium lycopersici* y la resistencia a este patógeno se atribuye a un solo gen dominante incompleto (*Sm*), el cual otorga tolerancia a cuatro especies de *Stemphyllium* sp. (Su et al., 2019).

### Marcadores moleculares para oomicetos

#### Tizón tardío (*Phytophthora infestans*)

La identificación del gen *Ph3* se realizó con los marcadores Ph3F/R (Jung et al., 2015), y se detectaron 15 líneas resistentes con la banda de 176 pb, pero no se encontraron líneas susceptibles (Figura 4). La presencia de múltiples genes de resistencia o tolerancia a *P. infestans* mejora el rendimiento de la planta frente a la enfermedad, aunque su valor puede ser limitado debido a la falta de durabilidad de la resistencia ante la aparición de nuevas variantes genéticas del patógeno (Scott, 2005). Por ello, se recomienda el uso de combinaciones de estos genes. Considerando el impacto y la rápida dispersión de esta enfermedad, la tolerancia genética a *P. infestans* es de gran interés en los programas de mejoramiento; además, se debe considerar que el gen *Ph3* confiere resistencia



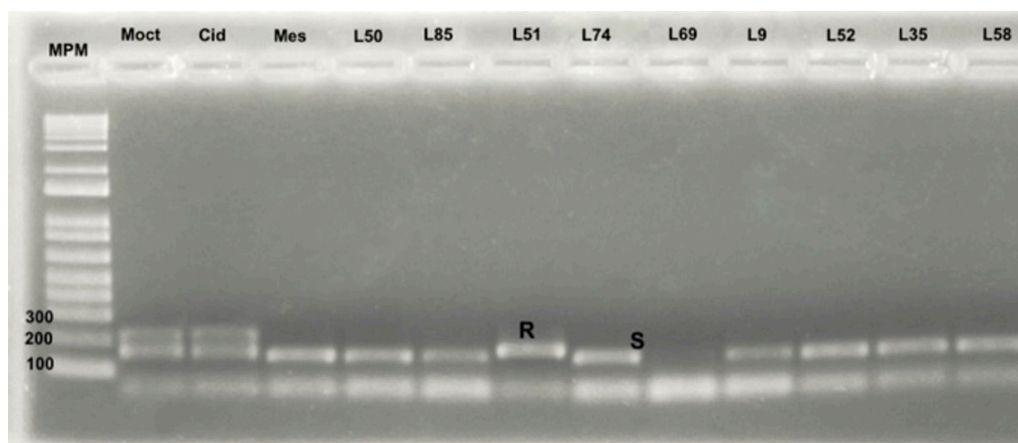


Figure 4. Amplification products of the Ph3 marker test for the *Ph3* resistance gene to *Phytophthora infestans*.

Figura 4. Productos de amplificación de la prueba del marcador Ph3 para el gene de resistencia *Ph3* a *Phytophthora infestans*.

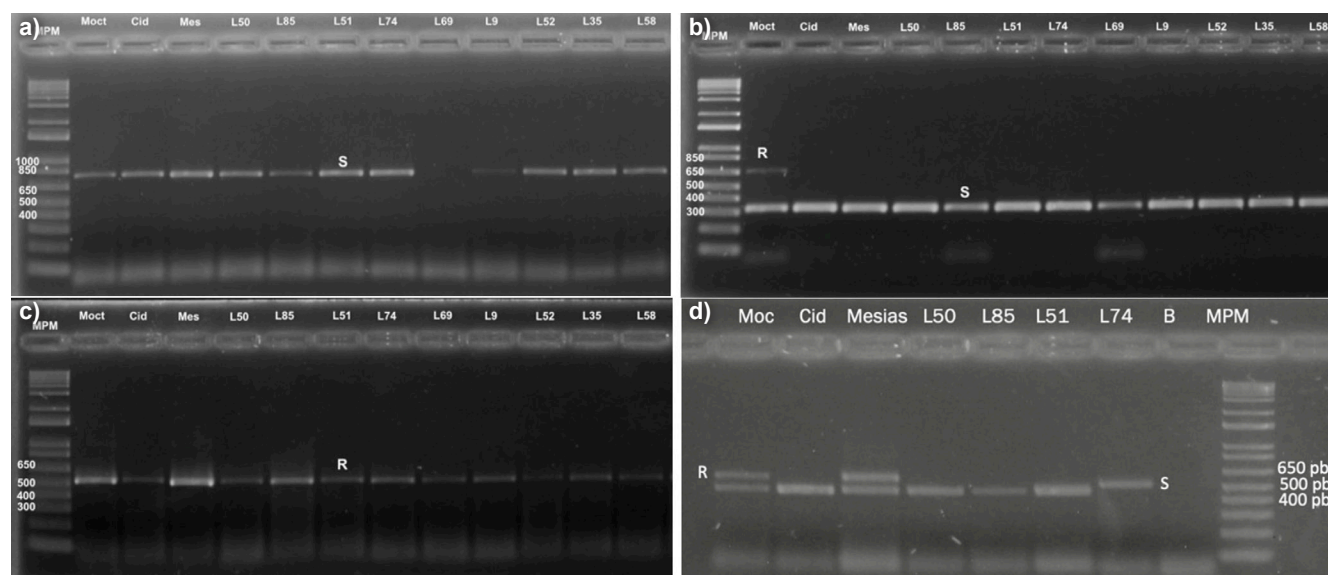


Figure 5. Amplification products of the marker test for virus resistance genes: a) TG0302 marker for the *Ty-2* gene, b) P6-25 marker for the *Ty-3* gene, c) Sw5b marker for the *Sw5b* gene and d) Sw-5-2 marker for the *Sw5b* gene.

Figura 5. Productos de amplificación de la prueba de marcadores para genes de resistencia a virus: a) marcador TG0302 para el gen *Ty-2*, b) marcador P6-25 para el gen *Ty-3*, c) marcador Sw5b para el gen *Sw5b* y d) marcador Sw-5-2 para el gen *Sw5b*.

for susceptibility, one of 450 bp for resistance to the *Ty-3b* locus, one of 630 bp for the *Ty-3a* locus and one of 660 bp for the *Ty-3* locus. Only the commercial hybrid Moctezuma showed heterozygous resistance and 17 lines were found to be susceptible (*Ty-3*) (Figure 5b). Nevame et al. (2018) developed a new marker to identify *Ty-3* resistance genes, using the ligated P6-25 marker. This marker is efficient in identifying *Ty-3*, *Ty-3a* and *Ty-3b*. *Ty* resistance genes confer partial resistance or tolerance to TYLCV. The *Ty-1* gene stands out for its effectiveness in the homozygous state for resistance to TYLCV, whereas *Ty-3* shows greater resistance to monopartite and bipartite viruses (Carbonell et al., 2018).

dominante incompleta (Robbins et al., 2010; Foolad & Panthee, 2012).

### Marcadores moleculares para virus

#### Virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV)

Se han identificado seis genes de tolerancia al TYLCV, patógeno de gran importancia económica (Verlaan et al., 2013; Wang et al., 2018). La identificación del gen *Ty-2* se realizó con los marcadores TG0302F/R (Hanson et al., 2016), los cuales generan dos bandas: una de 940 pb para genotipos resistentes y otra de 800 pb que indica susceptibilidad (Cuadro 1; Figura 5a). En

The Ty-3 gene, located on the long arm of chromosome six, is linked to the Ty-1 gene (Ji et al., 2007). The presence of homozygous alleles for Ty-1 resistance has been shown to reduce fruit yield (Carbonell et al., 2018) and other agronomic traits such as number of inflorescences per plant, number of inflorescences with fruit per plant, number of fruits per plant, fruit weight, marketable yield and titratable acidity. Its effect was particularly significant on total and marketable yields, which decreased by 50 % (Rubio et al., 2016).

The introduction of the Ty-1 gene entails other genes linked to negative effects on the production of volatile compounds and other metabolites. This suggests that the presence of DNA fragments associated with the Ty-1 gene is responsible for changes in the aromatic characteristics of tomato varieties, and no recombinations have been detected that allow separating them (Carbonell et al., 2018); therefore, it is recommended to keep it in a heterozygous state to counteract the effects of unwanted genes. To obtain lines with greater resistance to TYLCV, the presence of more than one Ty gene is needed. Some commercial hybrids have Ty-2 and Ty-3 in a heterozygous state, which gives them greater resistance than those with only one of them (Mejía et al., 2005; Hanson et al., 2016).

#### Spotted wilt virus (TSWV)

Of the eight genes identified for resistance to TSWV, the presence of the *Sw5b* gene, recognized as the most effective because it is not specific to a single variant (Scott et al., 2004; Saidi & Warade, 2008; Zaccardelli et al., 2008; Foolad et al., 2008), was evaluated. This gene was identified with the *Sw5bF/R* markers (Shi et al., 2011), which produce a 541 bp band in resistant genotypes. All 20 individuals evaluated presented the resistance band (Figure 5c). Shi et al. (2011) evaluated specific markers for the *Sw5b* gene in 26 lines, and with the *Sw5b* marker they identified the presence of the *Sw5* locus related to virus resistance. In this study, a second marker (*Sw-5-2F/R*) was used to identify the *Sw5b* gene, which is co-dominant (Dianese et al., 2010) and generates a resistance band of 574 bp and susceptibility bands of 510 and 464 bp (Table 1). Of the genotypes evaluated, 14 were homozygous recessive, one was homozygous dominant and two were heterozygous (Moctezuma and Mesias; Figure 5d).

#### Conclusions

Molecular markers were validated for 10 genes related to disease resistance that impact tomato cultivation. These markers allowed us to identify the presence of disease resistance genes in 17 advanced tomato lines. Specifically, markers associated with *Meloidogyne* sp.

ningún caso se identificaron líneas con la banda de resistencia, pero 18 genotipos mostraron la banda de susceptibilidad. Varios investigadores han utilizado los marcadores TG0302F/R para identificar líneas con el gen de resistencia a Ty-2 (Lee et al., 2015).

El gen Ty-3 se identificó con los marcadores P6-25F/R (Ji et al., 2007) que generan cuatro bandas: una de 320 pb para susceptibilidad, una de 450 pb para resistencia al locus *Ty-3b*, una de 630 pb para el locus *Ty-3a* y una de 660 pb para el locus *Ty-3*. Solo el híbrido comercial Moctezuma presentó resistencia heterocigótica y 17 líneas resultaron ser susceptibles (*Ty-3*) (Figura 5b). Nevame et al. (2018) desarrollaron un nuevo marcador para identificar genes de resistencia a Ty-3 mediante el marcador P6-25 ligado. Este marcador es eficiente para identificar a *Ty-3*, *Ty-3a* y *Ty-3b*. Los genes de resistencia a Ty confieren resistencia parcial o tolerancia al TYLCV. El gen *Ty-1* destaca por su eficacia en estado homocigoto para resistencia a TYLCV, mientras que *Ty-3* muestra mayor resistencia a los virus monopartitarios y bipartitarios (Carbonell et al., 2018).

El gen *Ty-3*, ubicado en el brazo largo del cromosoma seis, está ligado al gen *Ty-1* (Ji et al., 2007). La presencia de alelos homocigotos para la resistencia a *Ty-1* ha demostrado disminuir el rendimiento de frutos (Carbonell et al., 2018) y otros caracteres agronómicos como número de inflorescencias por planta, número de frutos por planta, peso de frutos, rendimiento comercial y acidez titulable. Su efecto fue particularmente significativo en los rendimientos total y comercial, los cuales disminuyeron en un 50 % (Rubio et al., 2016).

La introducción del gen *Ty-1* conlleva otros genes ligados con efectos negativos en la producción de compuestos volátiles y otros metabolitos. Esto sugiere que la presencia de fragmentos de ADN asociados con el gen *Ty-1* es responsable de los cambios en las características aromáticas de las variedades de tomate, y no se han detectado recombinaciones que permitan separarlos (Carbonell et al., 2018); por ello, se recomienda mantenerlo en estado heterocigótico para contrarrestar los efectos de los genes no deseados. Para obtener líneas con mayor resistencia a TYLCV, se necesita la presencia de más de un gen *Ty*. Algunos híbridos comerciales presentan *Ty-2* y *Ty-3* en estado heterocigótico, lo cual les confiere mayor resistencia que aquellos con solo uno de ellos (Mejía et al., 2005; Hanson et al., 2016).

#### Virus de la marchitez manchada (TSWV)

De los ocho genes identificados para resistencia al TSWV, se evaluó la presencia del gen *Sw5b*, reconocido

enabled the identification of both heterozygous and homozygous lines.

SCAR-type molecular markers can be used for assisted selection in gene introgression by backcrossing into outstanding yield and quality lines lacking alleles resistant to the six pathogens.

The use of molecular markers in breeding programs facilitates the detection of outstanding lines in the early stages of cultivation, which would speed up selection processes and generate savings by focusing only on plants with resistance. This strategy demonstrates greater efficacy compared to conventional breeding methods.

### End of English version

## References / Referencias

- Abewoy-Fentik, D. (2017). Review on genetics and breeding of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Advances in Crop Science and Technology*, 5(5). <https://doi.org/10.4172/2329-8863.1000306>
- Agarwal, M., Shrivastava, N., & Padh, H. (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports*, 27, 617-631. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0507-z>
- Alvarado-Rodríguez, G., García-López, J., & Fernández-Pavía, S. P. (2011). Enfermedades del jitomate (*Solanum lycopersicum*) cultivado en invernadero en la Zona Centro de Michoacán. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 29(1), 50-59. <https://www.redalyc.org/pdf/612/61221490005.pdf>
- Álvarez-Gil, M. (2011). La selección asistida por marcadores (MAS "Marker-assisted selection") en el mejoramiento genético del tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Cultivos Tropicales*, 32(2), 154-171. <https://www.redalyc.org/pdf/1932/193222357007.pdf>
- Arens, P., Mansilla, C., Deinum, D., Cavellini, L., Moretti, A., Rolland, S., van der Schoot, H., Calvache, D., Ponz, F., Collonnier, C., Mathis, R., Smilde, D., Caranta, C., & Vosman, B. (2010). Development and evaluation of robust molecular markers linked to disease resistance in tomato for distinctness, uniformity and stability testing. *Theoretical and Applied Genetics*, 120(3), 655-664. <https://doi.org/10.1007/s00122-009-1183-2>
- Bailey-Serres, J., Parker, J. E., Ainsworth, E. A., D. Oldroyd, G. E., & Schoedrer, J. I. (2019). Genetic strategies for improving crop yields. *Nature*, 575, 109-118. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1679-0>
- Carbonell, P., Alonso, A., Grau, A., Salinas, J., García-Martínez, S., & Ruiz, J. (2018). Twenty years of tomato breeding at EPSO-UMH: transfer resistance from wild types to local landraces-from the first molecular markers to genotyping by sequencing (GBS). *Diversity*, 10(1), 12. <https://doi.org/10.3390/d10010012>
- Devran, Z., Özalp, T., Studholme, D. J., & Tör, M. (2023). Mapping of the gene in tomato conferring resistance to root-knot nematodes at high soil temperature. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1267399. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1267399>
- como el más efectivo debido a que no es específico a una sola variante (Scott et al., 2004; Saidi & Warade, 2008; Zaccardelli et al., 2008; Foolad et al., 2008). Dicho gen se identificó con los marcadores Sw5bF/R (Shi et al., 2011), que producen una banda de 541 pb en genotipos resistentes. Los 20 individuos evaluados presentaron la banda de resistencia (Figura 5c). Shi et al. (2011) evaluaron marcadores específicos para el gen Sw5b en 26 líneas, y con el marcador Sw5b identificaron la presencia del locus Sw5 relacionado con la resistencia al virus. En este estudio, se empleó un segundo marcador (Sw-5-2F/R) para identificar el gen Sw5b, el cual es codominante (Dianese et al., 2010) y genera una banda de resistencia de 574 pb y bandas de susceptibilidad de 510 y 464 pb (Cuadro 1). De los genotipos evaluados, 14 resultaron homocigotos recesivos, uno homocigoto dominante y dos heterocigotos (Moctezuma y Mesias; Figura 5d).

## Conclusiones

Se validaron marcadores moleculares para 10 genes relacionados con la resistencia a enfermedades que impactan el cultivo de tomate. Estos marcadores permitieron identificar la presencia de genes de resistencia a enfermedades en 17 líneas avanzadas de tomate. Específicamente, los marcadores asociados a *Meloidogyne* sp. posibilitan la identificación de líneas tanto heterocigóticas como homocigóticas.

Los marcadores moleculares tipo SCAR se pueden emplear para la selección asistida en la introgresión de genes, mediante retrocruzamiento en líneas destacadas en rendimiento y calidad que carezcan de los alelos de resistencia a los seis patógenos.

El uso de marcadores moleculares en programas de mejoramiento genético facilita la detección de líneas destacadas en etapas tempranas del cultivo, lo cual agilizaría los procesos de selección y generaría ahorros al enfocarse únicamente en plantas con resistencia. Esta estrategia demuestra una mayor eficacia en comparación con los métodos convencionales de mejoramiento genético.

## Fin de la versión en español

- Dianese, É. C., de Noronha-Fonseca, M. E., Goldbach, R., Komelink, R., Inoue-Nagata, A. K., Resende, R., & Boiteux, L. (2010). 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. *Molecular Breeding*, 25, 143. <https://doi.org/10.1007/s11032-009-9329-0>
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19(1), 11-15. [https://webpages.charlotte.edu/~jweller2/pages/BINF8350f2011/BINF8350\\_Readings/Doyle\\_plantDNAextractCTAB\\_1987.pdf](https://webpages.charlotte.edu/~jweller2/pages/BINF8350f2011/BINF8350_Readings/Doyle_plantDNAextractCTAB_1987.pdf)



- El Mehrach, K., Gharsallah Chouchane, S., Mejia, L., Williamson, V. M., Vidavski, F., Hatimi, A., Salus, M. S., Martin, C. T., & Maxwell, D. P. (2005). PCR-based methods for tagging the *Mi-1* locus for resistance to root-knot nematode in begomovirus-resistant tomato germplasm. *Acta Horticulturae*, 695, 263-270. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.695.29>
- Foolad, M. R., & Panthee, D. R. (2012). Marker-assisted selection in tomato breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31(2), 93-123. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.616057>
- Foolad, M. R., Merk, H. L., & Ashrafi, H. (2008). Genetics, genomics and breeding of late blight and early blight resistance in tomato. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 27(2), 75-107. <https://doi.org/10.1080/07352680802147353>
- Hanson, P., Lu, S. F., Wang, J. F., Chen, W., Kenyon, L., Tan, C. W., Tee, K. L., Wang, Y. Y., Hsu, Y. C., Schafleitner, R., Ledesma, D., & Yang, R. Y. (2016). Conventional and molecular marker-assisted selection and pyramiding of genes for multiple disease resistance in tomato. *Scientia Horticulturae*, 201, 346-354. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.02.020>
- Ji, Y., Schuster, D. J., & Scott, J. W. (2007). *Ty-3*, a begomovirus resistance locus near the *Tomato yellow leaf curl virus* resistance locus *Ty-1* on chromosome 6 of tomato. *Molecular Breeding*, 20, 271-284. <https://doi.org/10.1007/s11032-007-9089-7>
- Jiang, G. L. (2013). *Molecular markers and marker-assisted breeding in plants*. Plant Breeding from Laboratories to Fields. <https://doi.org/10.5772/52583>
- Jung, J., Kim, H. J., Lee, J. M., Oh, C. S., Lee, H. J., & Yeam, I. (2015). Gene-based molecular marker system for multiple disease resistances in tomato against tomato yellow leaf curl virus, late blight, and verticillium wilt. *Euphytica*, 205(2), 599-613. <https://doi.org/10.1007/s10681-015-1442-z>
- Lee, J. M., Oh, C. S., & Yeam, I. (2015). Molecular markers for selecting diverse disease resistances in tomato breeding programs. *Plant Breeding and Biotechnology*, 3(4), 308-322. <https://doi.org/10.9787/PBB.2015.3.4.308>
- Liu, J., & Wang, X. (2020). Tomato diseases and pests detection based on improved Yolo V3 convolutional neural network. *Frontiers in Plant Science*, 11, 521544. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00898>
- Mejia, L., Teni, R. E., Vidavski, F., Czosnek, H., Lapidot, M., Nakhla, M. K., & Maxwell, D. P. (2005). Evaluation of tomato germplasm and selection of breeding lines for resistance to begomoviruses in Guatemala. *Acta Horticulturae*, 695, 251-255. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2005.695.27>
- Milligan, S. B., Bodeau, J., Yaghoobi, J., Kaloshian, I., Zabel, P., & Williamson, V. M. (1998). The root knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. *The Plant Cell*, 10(8), 1307-1319. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.8.1307>
- Neha, P., Solankey, S. S., Vati, L., & Chattopadhyay, T. (2016). Molecular screening of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) genotypes for resistance alleles against important biotic stresses. *Journal of Applied and Natural Science*, 8(3), 1654-1658. <https://doi.org/10.31018/jans.v8i3.1018>
- Nevame, A. Y., Xia, L., Nchongboh, C. G., Hasan, M. M., Alam, M. A., Yongbo, L., & Longting, S. (2018). Development of a new molecular marker for the resistance to tomato yellow leaf curl virus. *BioMed Research International*, 2018, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2018/8120281>
- Oladokun, J. O., & Mugisa, I. (2019). Exploring MAS: a reliable molecular tool for development of multiple disease resistance in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) through gene pyramiding. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 4(2), 509-516. <https://doi.org/10.22161/ijeab/4.2.35>
- Olivier, D., Maina, M., Andrew, O. E., Peter, M. M., & Careen, I. C. (2018). Application of molecular and biotechnological techniques in plant disease management: A review. *African Journal of Biotechnology*, 17(31), 938-948. <https://doi.org/10.5897/AJB2018.16532>
- Ori, N., Eshed, Y., Paran, I., Presting, G., Aviv, D., Tanksley, S., Zamir, D., & Fluhr, R. (1997). The *I2C* family from the wilt disease resistance locus *I2* belongs to the nucleotide binding, leucine-rich repeat superfamily of plant resistance genes. *The Plant Cell*, 9(4), 521-32. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.4.521>
- Panno, S., Davino, S., Caruso, A. G., Bertacca, S., Crnogorac, A., Mandić, A., Noris, E., & Matić, S. (2021). A review of the most common and economically important diseases that undermine the cultivation of tomato crop in the mediterranean basin. *Agronomy*, 11(11), 2188. <https://doi.org/10.3390/agronomy11112188>
- Robbins, M. D., Masud, M. A. T., Panthee, D. R., Gardner, R. G., Francis, D. M., & Stevens, M. R. (2010). Marker-assisted selection for coupling phase resistance to Tomato spotted wilt virus and *Phytophthora infestans* (late blight) in tomato. *HortScience*, 45(10), 1424-1428. <https://doi.org/10.21273/hortsci.45.10.1424>
- Rubio, F., Alonso, A., García-Martínez, S., & Ruiz, J. J. (2016). Introgression of virus-resistance genes into traditional Spanish tomato cultivars (*Solanum lycopersicum* L.): Effects on yield and quality. *Scientia horticulturae*, 198, 183-190. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.11.025>
- Saidi, M., & Warade, S. D. (2008). Tomato breeding for resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV): An overview of conventional and molecular approaches. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 44(3), 83-92. <https://doi.org/10.17221/47/2008-cjgpb>
- Scott, J. W. (2005). Perspectives on tomato disease resistance breeding: Past, present, and future. *Acta Horticulturae*, 695, 217-224. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.695.24>
- Scott, J. W., Agrama, H. A., & Jones, J. P. (2004). RFLP-based analysis of recombination among resistance genes to fusarium wilt races 1, 2, and 3 in tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129(3), 394-400. <https://doi.org/10.21273/jashs.129.3.0394>
- Seah, S., Yaghoobi, J., Rossi, M., Gleason, C. A., & Williamson, V. M. (2004). The nematode-resistance gene, *Mi-1*, is associated with an inverted chromosomal segment in susceptible compared to resistant tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 108(8), 1635-1642. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1594-z>
- Sela-Buurlage, M. B., Budai-Hadrian, O., Pan, Q., Carmel-Goren, L., Vunsch, R., Zamir, D., & Fluhr, R. (2001). Genome-wide dissection of *Fusarium* resistance in tomato reveals multiple complex loci. *Molecular Genetics and Genomics*, 265(6), 1104-1111. <https://doi.org/10.1007/s004380100509>
- Shi, A., Vierling, R., Grazzini, R., Chen, P., Caton, H., & Panthee, D. (2011). Identification of molecular markers for Sw-5 gene of tomato spotted wilt virus resistance. *American Journal*



- of *Biotechnology and Molecular Sciences*, 1(1), 8-16. <https://doi.org/10.5251/ajbms.2011.1.1.8.16>
- Simons, G., Groenendijk, J., Wijbrandi, J., Reijans, M., Groenen, J., Diergaarde, P., Lee, T., Bleekeer, M., Onstenk, J., de Both, M., Haring, M., Mes, J., Cornelissen, B., Zabeau, M., & Vos, P. (1998). Dissection of the *Fusarium I2* gene cluster in tomato reveals six homologs and one active gene copy. *The Plant Cell*, 10(6), 1055-1068. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.6.1055>
- Su, X., Zhu, G., Huang, Z., Wang, X., Guo, Y., Li, B., Du, Y., Yang, W., & Gao, J. (2019). Fine mapping and molecular marker development of the *Sm* gene conferring resistance to gray leaf spot (*Stemphylium* spp.) in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 132(4), 871-882. <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3242-z>
- Verlaan, M. G., Hutton, S. F., Ibrahim, R. M., Kormelink, R., Visser, R. G., Scott, J. W., Edwards, J. D., & Bai, Y. (2013). The tomato yellow leaf curl virus resistance genes *Ty-1* and *Ty-3* are allelic and code for DFDGD-class RNA-Dependent RNA polymerases. *PLOS Genetics*, 9(3), e1003399. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003399>
- Wang, Y., Zhang, Y., Gao, Z., & Yang, W. (2018). Breeding for resistance to tomato bacterial diseases in China: Challenges and prospects. *Horticultural Plant Journal*, 4(5), 193-207. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2018.08.004>
- Yang, X., Caro, M., Hutton, S.F., Scott, J. W., Guo, Y., Wang, X., Rashid, M. H., Szinay, D., Jong, H., Visser, R., Bai, Y., & Du, Y. (2014). Fine mapping of the tomato yellow leaf curl virus resistance gene *Ty-2* on chromosome 11 of tomato. *Molecular Breeding*, 34, 749-760. <https://doi.org/10.1007/s11032-014-0072-9>
- Yang, H., Zhao, T., Jiang, J., Chen, X., Zhang, H., Liu, G., Zhang, D., Dy, C., Wang, S., Xu, X., & Li, J. (2017a). Transcriptome analysis of the *Sm*-mediated hypersensitive response to *Stemphylium lycopersici* in tomato. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1-14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01257>
- Yang, H., Zhao, T., Jiang, J., Wang, S., Wang, A., Li, J., & Xu, X. (2017b). Mapping and screening of the tomato *Stemphylium lycopersici* resistance gene, *Sm*, based on bulked segregant analysis in combination with genome resequencing. *BMC Plant Biology*, 17(1), 266. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1215-z>
- Zaccardelli, M., Perrone, D., del Galdo, A., Campanile, F., Parrella, G., & Giordano, I. (2008). Tomato genotypes resistant to tomato spotted wilt virus evaluated in open field crops in Southern Italy. *Acta Horticulturae*, 789, 147-150. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.789.20>
- Zhang, J., & Panthee, D. R. (2021). Development of codominant SCAR markers to detect the *Pto*, *Tm22*, *I3* and *Sw5* genes in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plant Breeding*, 140(2), 342-348. <https://doi.org/10.1111/pbr.12902>