

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 999 584**

51 Int. Cl.:

A01H 5/08 (2008.01)

A01H 6/82 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.05.2018** **PCT/EP2018/064055**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2018** **WO18219941**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2018** **E 18727798 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2024** **EP 3629711**

54 Título: **Tolerancia en plantas de *Solanum lycopersicum* al *Tobamovirus* virus del fruto rugoso café del jitomate (TBRFV)**

30 Prioridad:

01.06.2017 EP 17305644

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

26.02.2025

73 Titular/es:

**VILMORIN & CIE (100.00%)
4, quai de la Mégisserie
75001 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**ASHKENAZI, VARDA;
ROTEM, YANIV;
ECKER, RON;
NASHILEVITZ, SHAI y
BAROM, NAAMA**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 999 584 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Tolerancia en plantas de *Solanum lycopersicum* al *Tobamovirus* virus del fruto rugoso café del jitomate (TBRFV)

5 Sector de la técnica

La presente invención se refiere a la tolerancia o resistencia en plantas de *Solanum lycopersicum*, también conocido como *Lycopersicon esculentum*, al *tobamovirus* virus del fruto rugoso café del jitomate (TBRFV por sus siglas en inglés). De manera más específica, la presente invención se refiere a plantas y frutos de jitomate que comprenden uno o más determinantes genéticos que conducen a tolerancia o resistencia al virus del fruto rugoso café del jitomate. La invención también se refiere a marcadores ligados a dichos uno o más determinantes genéticos y al uso de dichos marcadores para identificar o seleccionar los determinantes genéticos y para identificar o seleccionar plantas que portan dicha tolerancia o resistencia. La invención también se refiere a las semillas y progenie de dichas plantas y a diferentes usos de dichas plantas.

Estado de la técnica

Todas las formas cultivadas y comerciales del jitomate pertenecen a una especie más frecuentemente referida como *Lycopersicon esculentum* Miller. *Lycopersicon* es un género relativamente pequeño dentro de la extremadamente grande y diversa familia Solanaceae que se considera consta de alrededor de 90 géneros, incluyendo chile, tabaco y berenjena. El género *Lycopersicon* ha sido dividido en dos subgéneros, el complejo *esculentum* el cual contiene aquellas especies que pueden ser cruzadas fácilmente con el jitomate comercial y el complejo *peruvianum* el cual contiene aquellas especies que se cruzan con considerable dificultad (Stevens, M., y Rick, C. M. 1986). Debido a su valor como un cultivo, *L. esculentum* Miller se ha diseminado ampliamente en todo el mundo. Incluso si el origen exacto del jitomate cultivado aún no está claro, parece que este proviene del continente americano, siendo nativo de Ecuador, Perú y las islas Galápagos e inicialmente cultivado por los aztecas e incas ya en 700 AD. México parece haber sido el sitio de domesticación y la fuente de la primera introducción. Se supone que el jitomate "cherry", *L. esculentum* var. *cerasiforme*, es el ancestro directo de las formas modernas cultivadas.

El jitomate se cultiva por su fruto, ampliamente utilizado como un producto de mercado fresco o como producto procesado. Como cultivo, el jitomate se cultiva comercialmente donde sea que las condiciones ambientales permitan la producción de un rendimiento económicamente viable. La mayoría de los jitomates frescos de mercado se cosechan a mano en la etapa de madurez maduro en rama y verde maduro. Los jitomates frescos de mercado están disponibles todo el año. El jitomate para procesamiento se cosecha principalmente de forma mecánica y se utiliza en muchas formas, como jitomates enlatados, jugo de jitomate, salsa, puré, pasta de jitomate, o incluso catsup.

El jitomate es una especie diploide normalmente sencilla con doce pares de cromosomas diferenciados. Sin embargo, el jitomate poliploide también es parte de la presente invención. El jitomate cultivado es auto-fecundo y casi exclusivamente auto-polinizante. Las flores del jitomate son hermafroditas. Los cultivares comerciales inicialmente eran de polinización abierta. Debido a que se ha identificado vigor híbrido en los jitomates, los híbridos están reemplazando las variedades de polinización abierta al ganar más y más popularidad entre los agricultores con mejor rendimiento y uniformidad de las características de la planta. Debido a su amplia diseminación y alto valor, el jitomate ha sido fitomejorado intensivamente. Esto explica por qué actualmente está disponible una variedad tan amplia de jitomates. La forma puede variar de pequeña a grande, y existen los tipos cereza (cherry), ciruela, pera, en forma de bloque, redondo, y bistec.

Los jitomates se pueden agrupar por la cantidad de tiempo que toma para que las plantas maduren el fruto para cosecha y, en general los cultivares se consideran tempranos, de media temporada o de maduración tardía. Los jitomates también se pueden agrupar por el hábito de crecimiento de la planta: determinado, semi-determinado o indeterminado. Las plantas determinadas tienden a crecer primero su follaje, después despliegan flores que maduran como fruto si la polinización es exitosa. Todas las frutas tienden a madurar en una planta aproximadamente al mismo tiempo. Los jitomates indeterminados comienzan creciendo algo de follaje, después continúan produciendo follaje y flores a través de la temporada de crecimiento. Estas plantas tienden a tener fruto de jitomate en diferentes etapas de madurez en cualquier momento dado. Los jitomates semi-determinados tienen un fenotipo entre determinado e indeterminado, estos son tipos determinados típicos excepto que crecen más grandes que las variedades determinadas. Los desarrollos más recientes en el fitomejoramiento de jitomate han llevado a una gama más amplia de color de la fruta. Además del color rojo maduro estándar, de color blanco cremoso, verde limón, rosa, amarillo, dorado, naranja o púrpura. La semilla de jitomate híbrido comercial se puede producir mediante polinización manual. Se recolecta el polen del progenitor masculino y se aplica manualmente a la superficie estigmática de la endógama femenina. Antes y después de la polinización a mano, se cubren las flores para que los insectos no traigan polen extraño y creen una mezcla o impureza. Las flores se etiquetan para identificar el fruto polinizado a partir del cual se van a cosechar las semillas.

Una variedad de patógenos afecta la productividad de las plantas de jitomate, incluyendo virus, hongos, bacterias, nemátodos e insectos. Los jitomates son, entre otras cosas, susceptibles a muchos virus y por lo tanto la resistencia a virus es de gran importancia en la agricultura.

Los tobamovirus están entre los virus vegetales más importantes que causan daños graves en la agricultura, especialmente a cultivos de vegetales y de ornamentales en todo el mundo. Los tobamovirus son fácilmente transmitidos por medios mecánicos, así como a través de transmisión por semilla. Los tobamovirus generalmente son caracterizados por una partícula en forma de barra de aproximadamente 300 nm que encapsida un genoma de ARN positivo, de cadena individual que codifica para cuatro proteínas. En los jitomates, el virus del mosaico del tabaco (TMV), virus de mosaico del jitomate (ToMV) son temidos por los productores de todo el mundo ya que éstos pueden dañar gravemente la producción del cultivo, por ejemplo a través de maduración irregular (los frutos tienen parches amarillentos en la superficie y manchas café debajo de la superficie). Sin embargo, los fitomejoradores han identificado varios genes a lo largo de los años y hoy en día están disponibles variedades de jitomate resistentes a TMV y/o ToMV.

En años recientes, un brote severo de virus afectó áreas de producción de jitomate en el Medio Oriente, tal como en Jordania y en Israel. La mayoría de las variedades de jitomate afectadas se consideraban resistentes a TMV y/o ToMV, pero aún así fueron afectadas severamente y mostraron síntomas tipo TMV/ToMV típicos: mientras los de las hojas eran bastante similares a los síntomas de TMV/ToMV, los síntomas de los frutos fueron mucho más frecuentes y severos que los síntomas usuales de dichos virus con lesiones y deformaciones del fruto. La calidad del fruto fue muy baja y más bien no comercializable. Salem *et al* (Arch.Virol. 161 (2), 503-506. 2015) extrajeron ARN de frutos y hojas de plantas sintomáticas e hicieron diversas pruebas que llevaron a la identificación de una especie nueva de tobamovirus a la que propusieron nombrar virus del fruto rugoso café del jitomate (TBRF). La resistencia a TMV y/o ToMV no confiere resistencia a este nuevo virus TBRF.

Como los tobamovirus no se controlan fácilmente, sino a través de la mejora genética mediante la identificación y el uso en la reproducción de genes de resistencia, y como los genes de resistencia actualmente disponibles para controlar TMV y/o ToMV son inútiles contra los daños del nuevo virus del fruto rugoso café del jitomate, existe una necesidad urgente de identificar resistencia y/o tolerancia contra este nuevo tobamovirus, fallar en esto daría como resultado regiones enteras en las que ya no se podría producir cultivo de jitomate

Objeto de la invención

Los presentes inventores han identificado plantas de jitomate que despliegan una tolerancia o resistencia al virus del fruto rugoso café del jitomate y han podido localizar e identificar determinantes genéticos, también referidos en la presente solicitud como Locus de Rasgo Cuantitativo (QTL por sus siglas en inglés) que llevan a tolerancia o resistencia al virus del fruto rugoso café del jitomate.

La tolerancia o resistencia de conformidad con la presente invención es impartida por los determinantes genéticos recién descubiertos que confieren una tolerancia o resistencia al virus del fruto rugoso café del jitomate (TBRF) a nivel de las hojas de las plantas de jitomate infectadas por el virus, a nivel de los frutos de las plantas de jitomate infectadas por el virus o a nivel tanto de hojas como de frutos. Los determinantes genéticos recién descubiertos tienen una naturaleza recesiva. Debido a que la tolerancia y/o resistencia del fruto es impartida de manera independiente por dos QTL y la resistencia foliar por un QTL, su transferencia a diferentes fondos genéticos, es decir en diversos jitomates puede ser llevado a cabo fácilmente por un experto en fitomejoramiento, en especial dada la información con respecto a marcadores apropiados asociados con los QTL provistos por los inventores.

La presente invención por lo tanto provee estos determinantes genéticos, también nombrados QTL en la presente solicitud, que confieren, cuando están presentes en el estado homocigoto, el fenotipo de tolerancia o resistencia a TBRFV a nivel de las hojas y/o frutos de jitomate de las plantas de jitomate infectadas por el TBRFV.

La presente invención provee plantas de *S. lycopersicum* comerciales que despliegan tolerancia o resistencia a TBRFV así como métodos que producen o identifican plantas o poblaciones de *S. lycopersicum* (germoplasma) que despliegan resistencia a TBRFV. La presente invención también describe marcadores genéticos moleculares, en especial SNP, ligados a los QTL que conducen a tolerancia o resistencia al TBRFV, la cual puede ser tolerancia o resistencia de hojas y/o frutos y que son de una naturaleza recesiva.

La invención también provee varios métodos y usos de la información vinculada con estos SNP asociados al QTL que confiere tolerancia a TBRFV, entre otras cosas métodos para identificar plantas tolerantes a TBRFV y métodos para mejorar el rendimiento de la producción de jitomate en un ambiente infestado por TBRFV y métodos para proteger un campo de jitomate contra infestación por TBRFV.

Definiciones

El término "Resistencia" es como lo define la Sección de Cultivos Ornamentales y vegetales de la Federación Internacional de Semillas (ISF por sus siglas en inglés) para describir la reacción de las plantas a las plagas o patógenos, y tensiones abióticas para la Industria de Semillas Vegetales. Específicamente, con resistencia, se quiere decir la capacidad de una variedad vegetal para restringir el crecimiento y desarrollo de una plaga o patógeno específico y/o el daño que éstos ocasionan cuando se compara con variedades vegetales susceptibles bajo

condiciones ambientales y presión de la plaga o patógeno similares. Las variedades resistentes pueden exhibir algunos síntomas de enfermedad o daños bajo presión intensa de la plaga o patógeno.

5 El término "Tolerancia" se utiliza en la presente solicitud para indicar un fenotipo de una planta en el cual por lo menos algunos de los síntomas de enfermedad permanecen ausentes después de exposición de dicha planta a una dosis infecciosa de virus, con lo cual se puede establecer la presencia de una infección sistémica o local, multiplicación de virus, por lo menos la presencia de secuencias genómicas virales en las células de dicha planta y/o integración genómica de las mismas, por lo menos bajo algunas condiciones de cultivo. Por lo tanto las plantas tolerantes son resistentes respecto a la expresión de síntomas pero son portadores asintomáticos del virus. Algunas veces, las secuencias virales pueden estar presentes o incluso multiplicarse en las plantas sin ocasionar síntomas de enfermedad. Se debe entender que una planta tolerante, aunque esté infectada por el virus, generalmente es capaz de restringir por lo menos moderadamente el crecimiento y desarrollo del virus. Asimismo, algunas plantas pueden ser tolerantes bajo algunas condiciones de cultivo, y resistentes bajo condiciones diferentes. Por lo tanto tolerancia y resistencia no son mutuamente excluyentes.

15 En el caso de TBRFV, con tolerancia de la hoja, o tolerancia foliar, se quiere decir el fenotipo de una planta en el cual los síntomas de enfermedad en las hojas permanecen ausentes tras exposición de dicha planta a una dosis infecciosa de TBRFV. Sin embargo los síntomas de enfermedad en los frutos pueden estar presentes en plantas infectadas.

20 Con tolerancia del fruto, en el caso de TBRFV, se quiere decir el fenotipo de una planta en el cual los síntomas de enfermedad en los frutos siguen ausentes tras exposición de dicha planta a una dosis infecciosa de TBRFV. Sin embargo los síntomas de enfermedad en las hojas pueden estar presentes en las plantas infectadas.

25 Los síntomas de infección por TBRFV en las hojas generalmente incluyen mosaico, distorsión de los folíolos y en muchos casos también síntomas tipo agujeta de zapato. Los síntomas de infección por TBRFV en los frutos generalmente incluyen lesiones amarillas típicas y deformaciones de los frutos. En muchos casos también hay "manchas de chocolate" en los frutos.

30 Susceptibilidad: La incapacidad de una variedad vegetal de restringir el crecimiento y desarrollo de una plaga o patógeno especificada; una planta susceptible despliega los síntomas perjudiciales vinculados a la infección viral, específicamente los daños foliares y daños al fruto en el caso de infección por TBRFV.

35 Una planta de *S. lycopersicum* susceptible al virus del fruto rugoso café del jitomate, es por ejemplo la variedad Candela comercialmente disponible como se menciona en la publicación de Salem *et al.* de 2015. Esta también puede ser las líneas Hazera N° 2 y Hazera N° 4 mencionadas en la sección de ejemplos de la presente solicitud. Todas las variedades de jitomate comercialmente disponibles cultivadas en área infectada por TBRFV son, hasta la fecha, es decir antes de la presente invención, susceptibles a TBRFV.

40 Una planta de conformidad con la invención tiene, por lo tanto, por lo menos resistencia o tolerancia mejorada al virus del fruto rugoso café del jitomate, de manera más específica tolerancia foliar o tolerancia frutal a TBRFV mejorada, con respecto a la variedad Candela, y de manera más general con respecto a cualquier variedad comercial de jitomate cultivada en área infectada por el virus del fruto rugoso café del jitomate.

45 Tal como se utiliza en la presente solicitud, el término "descendencia" o "progenie" se refiere a cualquier planta que resulta como progenie a partir de una reproducción vegetativa o sexual de una o más plantas progenitoras o descendientes de las mismas. Por ejemplo una planta descendiente se puede obtener mediante clonación o autofecundación de una planta progenitora o mediante cruce de dos plantas progenitoras e incluye los descendientes de autofecundación así como las F1 o F2 o incluso generaciones posteriores. Una F1 es un descendiente de primera generación producido a partir de progenitores de los cuales por lo menos uno se utiliza por primera vez como donador de un rasgo, mientras que los descendientes de segunda generación (F2) o generaciones subsiguientes (F3, F4, etc.) son especímenes producidos a partir de los descendientes de autofecundación de las F1, F2 etc. Por lo tanto una F1 puede ser (y normalmente es) un híbrido que resulta de una cruce entre dos progenitores de raza pura (la raza pura es homocigota para un rasgo), mientras que una F2 puede ser (y normalmente es) un descendiente que resulta de la auto-polinización de dichos híbridos F1.

55 Tal como se utiliza en la presente solicitud, el término "cruza", "cruzar", "polinización cruzada" o "fecundación cruzada" se refieren al proceso mediante el cual el polen de una flor en una planta se aplica (de manera artificial o natural) al óvulo (estigma) de una flor en otra planta.

60 Tal como se utiliza en la presente solicitud, el término "determinante genético" y/o "QTL" se refiere(n) a cualquier segmento de ADN asociado con una función biológica. Por lo tanto, los QTL y/o determinantes genéticos incluyen, pero no se limitan a, genes, secuencias codificadoras y/o las secuencias reguladoras requeridas para su expresión. Los QTL y/o determinantes genéticos también pueden incluir segmentos de ADN no expresados que, por ejemplo, forman secuencias de reconocimiento para otras proteínas.

65

Tal como se utiliza en la presente solicitud, el término “genotipo” se refiere a la composición genética de una célula individual, cultivo celular, tejido, organismo (por ejemplo, una planta), o grupo de organismos.

5 Tal como se utiliza en la presente solicitud, el término “injertar” es la operación mediante la cual un patrón se injerta con una púa. El motivo principal para injertar es evitar daños por plagas y patógenos del suelo cuando no están disponibles estrategias genéticas o químicas para manejo de enfermedad. Injertar una púa susceptible en un patrón resistente puede proveer un cultivar resistente sin la necesidad de generar la resistencia en el cultivar. Además, injertar puede incrementar la tolerancia al estrés abiótico, incrementar el rendimiento y dar como resultado usos más eficientes del agua y los nutrientes.

10 Tal como se utiliza en la presente solicitud, el término “heterocigoto” se refiere a una célula individual o planta diploide o poliploide que tiene diferentes alelos (formas de un gen, determinante genético o secuencia dados) presentes por lo menos en un locus.

15 Tal como se utiliza en la presente solicitud, el término “heterocigoto” se refiere a la presencia de alelos diferentes (formas de un gen, determinante genético o secuencias dados) en un locus particular.

20 Tal como se utiliza en la presente solicitud, “cromosomas homólogos”, u “homólogos” (u homólogos), se refieren a un conjunto de un cromosoma materno y un cromosoma paterno que forman un par uno con el otro durante la meiosis. Estas copias tienen los mismos genes en los mismos loci y la misma ubicación de centrómero.

Tal como se utiliza en la presente solicitud, el término “homocigoto” se refiere a una célula individual o planta que tiene los mismos alelos en uno o más loci en todos los cromosomas homólogos.

25 Tal como se utiliza en la presente solicitud, el término “homocigoto” se refiere a la presencia de alelos idénticos en uno o más loci en segmentos cromosómicos homólogos.

30 Tal como se utiliza en la presente solicitud, el término “híbrido” se refiere a cualquier célula individual, tejido o planta que resulte de una cruce entre progenitores que difieren en uno o más genes.

35 Tal como se utiliza en la presente solicitud, el término “locus” (plural: “loci”) se refiere a cualquier sitio que ha sido definido genéticamente, éste puede ser una posición individual (nucleótido) o una región cromosómica. Un locus puede ser un gen, un determinante genético, o parte de un gen, o una secuencia de ADN, y puede estar ocupado por secuencias diferentes. Un locus también puede ser definido por un Polimorfismo de Nucleótido Individual (SNP por sus siglas en inglés), por varios SNP, o por dos SNP de flaqueo.

Tal como se utiliza en la presente solicitud, el término “patrón” es la parte inferior de una planta capaz de recibir una púa en un proceso de injerto.

40 Tal como se utiliza en la presente solicitud, el término “púa” es la parte superior de una planta capaz de ser injertada en un patrón en un proceso de injerto.

Descripción detallada de la invención

45 Los presentes inventores han identificado tres QTL los cuales, cuando están presentes de manera homocigota en una planta de *S. lycopersicum*, solos o en combinación tal como las combinaciones descritas en cualquier otra parte en la solicitud, proveen una tolerancia y/o resistencia mejorada en los frutos y/u hojas de una planta de jitomate infectada o con probabilidad de ser infectada por el virus del fruto rugoso café del jitomate (TBRF).

50 Los presentes inventores han identificado dos QTL, específicamente QTL1 y QTL2, los cuales cuando están presentes de manera homocigota en un fondo de *S. lycopersicum*, especialmente en los cromosomas 6 y 9, confieren de manera independiente o en combinación una tolerancia mejorada en los frutos de una planta de jitomate infectada o con probabilidad de ser infectada por el TBRFV. Además, los presentes inventores han identificado un QTL, el cual, cuando está presente de manera homocigota en un fondo de *S. lycopersicum*, especialmente en el cromosoma 11, confiere una tolerancia mejorada en las hojas de una planta de jitomate infectada o con probabilidad de ser infectada por el TBRFV. Cuando están presentes de manera homocigota en los cromosomas 6, 9 y 11, los tres QTL confieren tolerancia y/o resistencia mejorada tanto en las hojas como en los frutos de una planta de jitomate infectada o con probabilidad de ser infectada por el TBRFV.

60 Como se demuestra en los ejemplos, el fenotipo de las plantas de conformidad con la invención, en la mayoría de circunstancias, es mejor caracterizado como tolerancia más que resistencia a TBRFV, específicamente tolerancia foliar, tolerancia del fruto o ambas formas de tolerancia; bajo circunstancias específicas, las plantas de la invención exhiben, sin embargo, resistencia a TBRFV. En lo que sigue, se hace referencia a tolerancia a TBRFV; sin embargo, este fenotipo abarca el fenotipo de resistencia, bajo circunstancias específicas.

65 De conformidad con un primer aspecto, la invención está dirigida por lo tanto a una planta de *S. lycopersicum* que

comprende de manera homocigota en su genoma un locus de rasgo cuantitativo recesivo, designado QTL2, el cual cuando está presente de manera homocigota en un fondo de *S. lycopersicum*, en el cromosoma 9, confiere tolerancia en los frutos de una planta de jitomate infectada por el virus del fruto rugoso café del jitomate. La descripción, en una modalidad no reivindicada, también divulga una planta de *S. lycopersicum* que comprende en su

5 genoma un QTL, específicamente QTL1 el cual cuando está presente de manera homocigota en un fondo de *S. lycopersicum*, especialmente en el cromosoma 6, confiere una tolerancia mejorada a la infección por TBRFV en los frutos de una planta de jitomate. La invención está dirigida a una planta de *S. lycopersicum* que comprende de manera homocigota en su genoma un QTL recesivo, específicamente QTL2 el cual cuando está presente de manera homocigota en un fondo de *S. lycopersicum*, en el cromosoma 9, confiere una tolerancia mejorada a la infección por

10 TBRFV en los frutos de una planta de jitomate.

De conformidad con una modalidad, la invención también está dirigida a una planta de *S. lycopersicum* que comprende de manera homocigota en su genoma un QTL recesivo, designado QTL3, el cual, cuando está presente de manera homocigota en un fondo de *S. lycopersicum*, en el cromosoma 11, confiere una tolerancia mejorada en las hojas de una planta de jitomate infectada por el virus del fruto rugoso café del jitomate.

15

La invención de manera más específica está dirigida a plantas que comprenden de manera homocigota en sus genomas QTL2 en el cromosoma 9, el cual confiere tolerancia del fruto a TBRFV. La invención también está dirigida a plantas que comprenden de manera homocigota en sus genomas QTL3 en el cromosoma 11 que confiere tolerancia foliar a TBRFV.

20

De conformidad con una modalidad, la invención está dirigida a una planta de *S. lycopersicum* que comprende en su genoma la combinación de QTL2 y QTL3 los cuales cuando están presentes de manera homocigota en un fondo de *S. lycopersicum*, confieren una tolerancia y/o resistencia mejorada en los frutos y hojas de una planta de jitomate infectada por el virus del fruto rugoso café del jitomate. Ambos QTL de preferencia están presentes de manera homocigota.

25

La invención también está dirigida a una célula de dichas plantas provenientes de aspectos previos, que comprende dichos QTL. Los QTL de conformidad con la invención y que confieren la tolerancia mejorada a TBRFV se eligen a partir de aquellos presentes en el genoma de las semillas de HAZTBRFVRES1. Una muestra de estas semillas de *S. lycopersicum* ha sido depositada por Hazera Seeds Ltd. Berurim, M. Shimim 79837, Israel, de conformidad con y en cumplimiento de los requerimientos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del depósito de Microorganismos para el Propósito de procedimiento de Patente ("el Tratado de Budapest" con el Depósito Nacional de Bacterias Industriales, de Alimentos y Marinas (NCIMB por sus siglas en inglés) (NCIMB, Ltd, Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB21 9YA, Reino Unido) el 16 de mayo de 2017 bajo el número de accesión 42758. Un depósito de esta semilla de jitomate es mantenido por Hazera Seeds Ltd. Berurim, M.P. Shimim 79837, Israel.

30

35

Los QTL que confieren la tolerancia mejorada a TBRFV están localizados en el cromosoma 9 para QTL2 y en el cromosoma 11 para QTL3. Están dentro de un intervalo cromosómico del cromosoma 9 el cual comprende el SNP TO-0180955 (SEQ ID NO:3) y el SNP TO-0196109 (SEQ ID NO:6) para QTL2 y dentro de un intervalo cromosómico del cromosoma 11 el cual comprende el SNP TO-0122252 (SEQ ID NO:7) y el SNP TO-0162427 (SEQ ID NO: 18) para QTL3.

40

QTL1 está dentro de un intervalo cromosómico del cromosoma 6 el cual comprende el SNP TO-0005197 (SEQ ID NO:1) y el SNP TO-0145581 (SEQ ID NO:2)

45

Los polimorfismos específicos correspondientes a los SNP (Polimorfismo de Nucleótido Individual) a los que se hace referencia en esta descripción, así como las secuencias de flanqueo de estos SNP en el genoma de *S. lycopersicum*, se dan en la sección experimental (véase entre otras las tablas 4, 5, 6, 7, 9 y 10) y en el listado de secuencias anexo. Su ubicación con respecto a la versión 2.40 del genoma de jitomate, en los cromosomas 6, 9 y 11, se indica en las tablas 4, 6 y 9 y sus secuencias de flanqueo también se ilustran en las tablas 5, 7 y 10, y en el listado de secuencias.

50

A este respecto se debe indicar que, por definición, un SNP se refiere a un nucleótido individual en el genoma, el cual es variable dependiendo del alelo que esté presente, mientras que los nucleótidos de flanqueo son idénticos. Para facilidad de identificación clara de la posición de los diferentes SNP, sus posiciones se dan en las tablas 4, 6 y 9, por referencia a la secuencia del genoma del jitomate en su versión 2.40 y por referencia a sus secuencias de flanqueo, identificadas mediante el número de identificación de secuencia (SEQ ID NO). En la secuencia asociada con un SNP específico en la presente solicitud, por ejemplo SEQ ID No: 1 para el SNP TO-0005197, solamente un nucleótido dentro de la secuencia corresponde realmente al polimorfismo, específicamente el nucleótido 61 de SEQ ID No: 1 corresponde a la posición polimórfica de SNP TO-0005197, el cual puede ser T o C como se indica en las tablas 4, 5 y 6. Las secuencias de flanqueo se dan para posicionar el SNP en el genoma pero no son parte del polimorfismo como tal.

55

60

65

Los presentes inventores han identificado que los QTL responsables del fenotipo de interés, es decir una tolerancia

mejorada en sus hojas y/o frutos cuando es infectada por el TBRFV van a ser encontrados en las regiones cromosómicas mencionadas anteriormente, identificando la presencia de secuencias en diferentes loci a lo largo de dicha región, específicamente en 18 loci diferentes definidos por los siguientes 18 SNP: TO-0005197 (SEQ ID NO:1) y TO-0145581 (SEQ ID NO:2) para QTL1 en el cromosoma 6, TO-0180955 (SEQ ID NO:3), TO-0196724 (SEQ ID NO:4), TO-0145125 (SEQ ID NO:5) y TO-0196109 (SEQ ID NO:6) para QTL2 en el cromosoma 9 y TO-0122252 (SEQ ID NO:7), TO-0144317 (SEQ ID NO:8), TO-0142270 (SEQ ID NO:9), TO-0142294 (SEQ ID NO: 10), TO-0142303 (SEQ ID NO: 11), TO-0142306 (SEQ ID NO:12), TO-0182276 (SEQ ID NO:13), TO-0181040 (SEQ ID NO:14), TO-0123057 (SEQ ID NO:15), TO-0125528 (SEQ ID NO: 16), TO-0162432 (SEQ ID NO: 17) y TO-0162427 (SEQ ID NO: 18) para QTL3 en el cromosoma 11.

Una planta de jitomate de conformidad con la invención que tiene una tolerancia mejorada en sus frutos cuando es infectada por el TBRFV tiene QTL que imparte dicho fenotipo en por lo menos uno de los cuatro loci en el cromosoma 9 detallado anteriormente.

Una planta de jitomate de conformidad con la invención que tiene una tolerancia mejorada en sus hojas cuando es infectada por el TBRFV tendrá los QTL en por lo menos uno de los loci en el cromosoma 11.

Una planta de jitomate de conformidad con la invención que tiene una tolerancia mejorada a nivel tanto de sus hojas como de sus frutos cuando es infectada por el virus del fruto rugoso café del jitomate tendrá secuencias que confieren el fenotipo en por lo menos uno de los loci en el cromosoma 9, y por lo menos uno de los loci en el cromosoma 11.

Por lo tanto, de conformidad con un aspecto no reivindicado, los QTL presentes en el genoma de una planta, semilla o célula de la invención de preferencia se van a encontrar por lo menos en uno o más de los 18 loci que abarcan dichos 18 SNP mencionados anteriormente, específicamente el locus que abarca TO-0005197 (SEQ ID NO: 1), el locus que abarca TO-0145581 (SEQ ID NO:2) para QTL1 en el cromosoma 6, el locus que abarca TO-0180955 (SEQ ID NO:3), el locus que abarca TO-0196724 (SEQ ID NO:4), el locus que abarca TO-0145125 (SEQ ID NO:5), el locus que abarca TO-0196109 (SEQ ID NO:6), para QTL2 en el cromosoma 9, el locus que abarca TO-0122252 (SEQ ID NO:7), el locus que abarca TO-0144317 (SEQ ID NO:8), el locus que abarca TO-0142270 (SEQ ID NO:9), el locus que abarca TO-0142294 (SEQ ID NO: 10), el locus que abarca TO-0142303 (SEQ ID NO: 11), el locus que abarca TO-0142306 (SEQ ID NO: 12), el locus que abarca TO-0182276 (SEQ ID NO: 13), el locus que abarca TO-0181040 (SEQ ID NO: 14), el locus que abarca TO-0123057 (SEQ ID NO: 15), el locus que abarca TO-0125528 (SEQ ID NO: 16), el locus que abarca TO-0162432 (SEQ ID NO: 17) y el locus que abarca TO-0162427 (SEQ ID NO: 18) para QTL3 en el cromosoma 11.

Para una planta de jitomate de conformidad con la invención, cuyos frutos tienen una tolerancia mejorada cuando son infectados por el TBRFV, los QTL presentes en el genoma de una planta, semilla o célula de dicha planta de jitomate de preferencia se van a encontrar por lo menos en uno o más de los siguientes loci: el locus que abarca TO-0180955, el locus que abarca TO-0196724, el locus que abarca TO-0145125 y el locus que abarca TO-0196109 para QTL2 en el cromosoma 9.

Para una planta de jitomate de conformidad con la invención, cuyas hojas tienen una tolerancia mejorada cuando son infectadas por el TBRFV, los QTL presentes en el genoma de una planta, semilla o célula de dicha planta de jitomate de preferencia se van a encontrar por lo menos en uno o más de los siguientes loci: el locus que abarca TO-0122252, el locus que abarca TO-0144317, el locus que abarca TO-0142270, el locus que abarca TO-0142294, el locus que abarca TO-0142303, el locus que abarca TO-0142306, el locus que abarca TO-0182276, el locus que abarca TO-0181040, el locus que abarca TO-0123057, el locus que abarca TO-0125528, el locus que abarca TO-0162432 y el locus que abarca TO-0162427 para QTL3 en el cromosoma 11.

Para una planta de jitomate de conformidad con la invención que tiene una tolerancia mejorada tanto en sus hojas como en sus frutos cuando es infectada por el TBRFV, los QTL presentes en el genoma de una planta, semilla o célula de la invención de preferencia se van a encontrar por lo menos en uno o más de los 4 loci que abarcan los SNP en el cromosoma 9, específicamente el locus que abarca TO-0180955, el locus que abarca TO-0196724, el locus que abarca TO-0145125 y el locus que abarca TO-0196109, y también por lo menos en uno o más de los 12 loci que abarcan los SNP en el cromosoma 11, específicamente el locus que abarca TO-0122252, el locus que abarca TO-0144317, el locus que abarca TO-0142270, el locus que abarca TO-0142294, el locus que abarca TO-0142303, el locus que abarca TO-0142306, el locus que abarca TO-0182276, el locus que abarca TO-0181040, el locus que abarca TO-0123057, el locus que abarca TO-0125528, el locus que abarca TO-0162432 y el locus que abarca TO-0162427.

Los alelos de los 18 SNP que corresponden a los QTL que confieren la tolerancia a TBRFV son alelo T de TO-0005197, alelo C de TO-0145581, alelo G de TO-0180955, alelo C de TO-0196724, alelo G de TO-0145125, alelo G de TO-0196109, alelo T de TO-0122252, alelo C de TO-0144317, alelo T de TO-0142270, alelo G de TO-0142294, alelo A de TO-0142303, alelo A de TO-0142306, alelo G de TO-0182276, alelo G de TO-0181040, alelo G de TO-0123057, alelo A de TO-0125528, alelo C de TO-0162432 y alelo T de TO-0162427. La presencia de los QTL que confieren la tolerancia a TBRFV puede ser revelada por la presencia de dichos alelos específicos. Los alelos de

estos SNP pueden reflejar por lo tanto la presencia de los QTL conforme definido.

De conformidad con una modalidad preferida de la presente invención, los QTL que confieren la tolerancia a TBRFV están en uno o más intervalos cromosómicos delimitados por los SNP de la presente invención. El QTL2 está en un intervalo cromosómico del cromosoma 9 delimitado en un lado por SNP TO-0180955 y en el otro lado por SNP TO-0196109.

El QTL3 está en un intervalo cromosómico del cromosoma 11 delimitado en un lado por SNP TO-0122252 y en el otro lado por TO-0162427. Los intervalos cromosómicos más preferidos del cromosoma 11 dentro del cual se va a encontrar a QTL3 son el intervalo delimitado por TO-0144317 y TO-0125528, el intervalo delimitado por TO-0142270 y TO-0162432, el intervalo delimitado por TO-0144317 y TO-0162432, y el intervalo delimitado por TO-0142270 y TO-0125528. El intervalo incluso más preferido es el intervalo delimitado por TO-0142270 y TO-0125528. Otro intervalo preferido es el intervalo delimitado por y que comprende TO-0142294 y TO-0125528.

A este respecto se indica que las posiciones específicas en un cromosoma pueden de hecho ser definidas con respecto a polimorfismo de nucleótido individual, en tanto que las secuencias de flaqueo de dichos SNP se definan con el fin de posicionarlas inequívocamente en el genoma. Los presentes inventores han utilizado los SNP, identificados por sus secuencias de flaqueo, con diferentes alelos, para identificar y seguir los QTL de la presente invención.

Una región cromosómica delimitada por dos SNP X y Y se refiere a la sección del cromosoma que yace entre las posiciones de estos dos SNP y que comprende dichos SNP, por lo tanto la secuencia de nucleótido de esta región cromosómica comienza con el nucleótido que corresponde a SNP X y termina con el nucleótido que corresponde a SNP Y, es decir los SNP están comprendidos dentro de la región que éstos delimitan, en el sentido de la invención.

En una planta, semilla o célula de la invención, la presencia de los QTL que confieren el fenotipo de interés de preferencia está caracterizada TO-0180955, TO-0196724, TO-0145125 y/o TO-0196109 para el QTL2 en el cromosoma 9 cuando la tolerancia a TBRFV es una tolerancia del fruto y de preferencia caracterizada por TO-0122252, TO-0144317, TO-0142270, TO-0142294, TO-0142303, TO-0142306, TO-0182276, TO-0181040, TO-0123057, TO-0125528, TO-0162432 y TO-0162427, de manera más preferida por TO-0142294, TO-0142303, TO-0142306, TO-0182276, TO-0181040, TO-0123057, TO-0125528, y de manera incluso más preferida TO-0182276, para el QTL3 en el cromosoma 11 cuando la tolerancia a TBRFV es una tolerancia foliar.

Cuando están presentes de manera homocigota en el genoma de una planta de jitomate de conformidad con la invención, QTL2 confiere resistencia/tolerancia del fruto a TBRFV y QTL3 confiere resistencia/tolerancia foliar a TBRFV. Cuando QTL2 y QTL3 están presentes de manera homocigota, dicha planta tiene una tolerancia de fruto y foliar a TBRFV mejorada.

La descripción también divulga, en una modalidad no reivindicada, plantas híbridas de *S. lycopersicum*, que se pueden obtener cruzando una planta que tiene el fenotipo mejorado y que tiene de manera homocigota uno o más de los QTL de la invención, con otro *S. lycopersicum*.

De preferencia, una planta de *S. lycopersicum* de conformidad con la invención es una planta o línea comercial. Dicha planta o línea comercial de preferencia también exhibe resistencia a ToMV (virus del mosaico del jitomate), por ejemplo debido a la presencia de un gen de resistencia Tm-2 (alelo Tm-2 o Tm-22 (también conocido como Tm-2a)) o Tm-1, el cual también confiere resistencia a TMV (virus del mosaico del tabaco). Una planta de conformidad con este aspecto de la invención de preferencia también tiene las siguientes características adicionales: rasgo de resistencia a nemátodos (Mi-1 o Mi-j), así como resistencias a Fusarium y Verticillium.

También se contemplan otras resistencias o tolerancias de conformidad con la invención.

De conformidad con una modalidad preferida, una planta de la invención no es resistente al virus del mosaico del pepino (PepMV). De conformidad con otra modalidad, una planta de jitomate de la invención también es resistente a PepMV.

De conformidad incluso con otra modalidad, una planta de la invención es una planta determinada, indeterminada o semi-indeterminada, o semilla o célula de la misma, es decir que corresponde al hábito de crecimiento determinado, indeterminado o semi-indeterminado.

Con determinada, se quiere decir plantas de jitomate que tienden a crecer primero su follaje, después despliegan flores que maduran como fruto si la polinización es exitosa. Todos los frutos tienden a madurar en una planta aproximadamente al mismo tiempo. Los jitomates indeterminados inician creciendo algo de follaje, después continúan produciendo follaje y flores a lo largo de la temporada de cultivo. Estas plantas tienden a tener fruto de jitomate en diferentes etapas de madurez en cualquier momento dado. Los jitomates semi-determinados tienen un fenotipo entre determinado e indeterminado, estos son tipos determinados típicos excepto que crecen más grandes que las variedades determinadas.

- De conformidad incluso con otra modalidad, una planta de la invención se utiliza como una púa o como un patrón en un proceso de injerto. Injertar es un proceso que se ha utilizado durante muchos años en cultivos tales como las cucurbitáceas, pero sólo más recientemente para jitomate. El proceso de injertar se puede utilizar para proveer un
- 5 cierto nivel de resistencia a patógenos telúricos tales como *Phytophthora* o a algunos nemátodos. Por lo tanto, el proceso de injertar está pensado para evitar el contacto entre la planta o variedad que se va a cultivar y el suelo infestado. La variedad de interés utilizada como el injerto o púa, opcionalmente un híbrido F1, se injerta en la planta resistente utilizada como el patrón. El patrón resistente permanece sano y provee, a partir de los suelos, el suministro normal para el injerto que éste aísla de las enfermedades.
- 10 Asimismo, la planta comercial de la invención da origen a frutos en condiciones apropiadas, los cuales son de por lo menos 25 gramos en plena madurez, de preferencia por lo menos 100 g en plena madurez y o incluso más preferido por lo menos 200 g en plena madurez.
- 15 Como se detalló anteriormente, la invención está dirigida a plantas de *S. lycopersicum*, que exhiben el fenotipo mejorado.
- Una planta de conformidad con la invención puede ser una progenie o descendencia de una planta cultivada a partir de las semillas depositadas HAZTBRFVRES1, depositadas en el NCIMB bajo el número de accesión NCIMB 42758, por auto-fecundación o como descendencia de primera generación. Las plantas cultivadas a partir de las semillas depositadas son en efecto homocigotas para los QTL de la invención que confieren el fenotipo mejorado, por lo tanto éstas tienen en su genoma los QTL de interés en cada uno de los homólogos del cromosoma 6, 9 y 11. Éstas se pueden utilizar para transferir estas secuencias en otro fondo mediante cruce y auto-fecundación y/o retrocruza.
- 20 La invención también está dirigida a las semillas depositadas de HAZTBRFVRES1 (NCIMB 42758) y a las plantas cultivadas a partir de una de estas semillas. Estas semillas contienen de manera homocigota los QTL que confieren el fenotipo de interés. Se indica que estas semillas no corresponden a una variedad vegetal, éstas no son homocigotas para la mayoría de los genes excepto los QTL de la invención; su fenotipo por lo tanto no se fija durante la propagación, excepto por la resistencia/tolerancia de fruto y foliar de la invención; la mayoría de sus rasgos fenotípicos se segregan durante la propagación, con excepción de la resistencia/tolerancia a TBRFV de fruto y foliar de la invención.
- 25 La invención también está dirigida a plantas como se definió anteriormente, es decir que contienen uno o dos QTL de interés en estado homocigoto, dichas secuencias confieren el fenotipo mejorado cuando están presentes de manera homocigota, cuyas plantas o semillas se pueden obtener transfiriendo los QTL desde una planta de *S. lycopersicum*, las semillas representativas de la misma se depositaron bajo la accesión del NCIMB NCIMB-42758, hacia otro fondo genético de *S. lycopersicum*, por ejemplo cruzando dicha planta con un segundo progenitor de planta de jitomate y selección de la planta que tiene los QTL responsables del fenotipo de interés. En dicha cruce, se podría transferir QTL2 y/o QTL 3. De preferencia, para obtener una planta que tenga tolerancia de fruto, se va a transferir QTL2, para obtener una planta que tenga tolerancia foliar, QTL 3 será transferido y para obtener una planta que tenga tolerancia tanto de fruto como foliar, serán transferidos QTL2 y QTL3 desde las semillas depositadas de HAZTBRFVRES1 (NCIMB 42758).
- 30 Se indica que las plantas de la invención se pueden obtener mediante procesos diferentes, y no se obtienen exclusivamente por medio de un proceso esencialmente biológico.
- 35 De conformidad con un aspecto no reivindicado, la invención se refiere a una planta o semilla de jitomate, de preferencia una planta o semilla de jitomate que no ocurre de manera natural, la cual puede comprender una o más mutaciones en su genoma, que provee a la planta una tolerancia de fruto y/o una tolerancia foliar al virus del fruto rugoso café del jitomate, cuya mutación es como está presente, por ejemplo, en el genoma de las plantas de las cuales se depositó una muestra representativa en el NCIMB bajo el número de depósito NCIMB 42758.
- 40 En otro aspecto no reivindicado, las mutaciones se inducen por medio de ingeniería genética. Dichas mutaciones también incluyen la integración de secuencias que confieren la resistencia de fruto y/o foliar a TBRFV, así como la sustitución de secuencias residentes con secuencias alternativas que confieren la resistencia o tolerancia de fruto y/o foliar a TBRFV. De preferencia, las mutaciones son la integración de uno o más de QTL1, QTL2 y QTL3 como se describieron anteriormente, en reemplazo de las secuencias homólogas de una planta de *S. lycopersicum*. De manera incluso más preferida, la mutación es la sustitución de la secuencia comprendida dentro de SNP TO-0122252 (SEQ ID NO:7) y SNP TO-0162427 (SEQ ID NO:18) en el cromosoma 11 del genoma de *S. lycopersicum*, o un fragmento de la misma, con la secuencia homóloga en el cromosoma 11 presente en el genoma de una planta de la cual una muestra representativa se depositó en el NCIMB bajo el número de depósito NCIMB 42758, en la cual la secuencia o fragmento de la misma confiere resistencia foliar a TBRFV.
- 45 Los medios de ingeniería genética que se pueden utilizar incluyen el uso de todas de dichas técnicas llamadas Nuevas Técnicas de Fitomejoramiento las cuales son diversas tecnologías novedosas desarrolladas y/o utilizadas para crear nuevas características en las plantas a través de variación genética, siendo el objetivo mutagénesis
- 50
- 55
- 60
- 65

dirigida, introducción dirigida de nuevos genes o silenciamiento de genes (RdDM). Los ejemplos de dichas nuevas técnicas de fitomejoramiento son cambios de secuencia dirigidos facilitados a través del uso de tecnología con nucleasa de dedo de zinc (ZFN por sus siglas en inglés) (ZFN-1, ZFN-2 y ZFN-3, véase patente E.U.A No. 9,145,565), mutagénesis dirigida a oligonucleótido (ODM por sus siglas en inglés), Cisgénesis e intragénesis, injerto (en patrón genéticamente modificado), fitomejoramiento invertido, Agro-infiltración (agro-infiltración "*sensu stricto*", agro-inoculación, inmersión floral), nucleasas efectoras tipo activador de transcripción (TALEN por sus siglas en inglés, véase patentes E.U.A. Nos. 8,586,363 y 9,181,535), el sistema CRISPR/Cas (véase patentes E.U.A. Nos. 8,697,359; 8,771,945; 8,795,965; 8,865,406; 8,871,445; 8,889,356; 8,895,308; 8,906,616; 8,932,814; 8,945,839; 8,993,233; y 8,999,641), meganucleasa diseñada endonucleasas de acentamiento re-diseñadas, edición de genoma guiada por ADN (Gao et al., Nature Biotechnology (2016)), y genómicos sintéticos. Una parte importante de edición de genoma dirigida, otra designación para Nuevas Técnicas de Fitomejoramiento, son las aplicaciones para inducir una ruptura de la doble cadena del ADN (DSB por sus siglas en inglés) en una ubicación seleccionada en el genoma en la cual se pretende la modificación. La reparación dirigida de la DSB permite la edición dirigida del genoma. Dichas aplicaciones se pueden utilizar para generar mutaciones (por ejemplo, mutaciones dirigidas o edición precisa del gen nativo) así como inserción precisa de genes (por ejemplo, cisgenes, intragenes, o transgenes). Las aplicaciones que llevan a mutaciones con frecuencia son identificadas como tecnología de nucleasa dirigida a sitio (SDN por sus siglas en inglés), tal como SDN1, SDN2 y SDN3. Para SDN1, el resultado es una mutación por delección genética no específica, dirigida: la posición de la DSB del ADN se selecciona de manera precisa, pero la reparación del ADN por parte de la célula hospedera es aleatoria y da como resultado delecciones, adiciones o sustituciones de nucleótido pequeñas. Para SDN2, se utiliza una SDN para generar una DSB dirigida y se utiliza una plantilla de reparación de ADN (una secuencia de ADN corta idéntica a la secuencia de ADN de la DSB elegida como blanco excepto por uno o unos cuantos cambios de nucleótido) para reparar la DSB: esto da como resultado una mutación puntual dirigida y predeterminada en el gen de interés deseado. En cuanto a la SDN3, la SDN se utiliza junto con una plantilla de reparación de ADN que contiene secuencia de ADN nueva (por ejemplo gen). El resultado de la tecnología podría ser la integración de dicha secuencia de ADN en el genoma de la planta. La aplicación más probable que ilustra el uso de SDN3 sería la inserción de cassettes de expresión cisgénicos, intragénicos, o transgénico en una ubicación del genoma seleccionada. Una descripción completa de cada una de estas técnicas se puede encontrar en el reporte hecho por el Centro Común de Investigación (Joint Research Center (JRC por sus siglas en inglés)) Instituto para Estudios Tecnológicos Prospectivos de la Comisión Europea en 2011 y titulada "New plant breeding techniques - State-of-the-art and prospects for commercial development".

La invención en otro aspecto también se refiere a partes vegetales de dicha planta de la invención, y de manera más preferida explante, púa, corte, semilla, fruto, raíz, patrón para injerto, polen, óvulo, embrión, protoplasto, hoja, antera, tallo, peciolo, y cualesquiera otras partes vegetales, en el cual dicha planta, explante, púa, corte, semilla, fruto, raíz, patrón para injerto, polen, óvulo, embrión, protoplasto, hoja, antera, tallo, peciolo, y/o parte vegetal se puede obtener a partir de una planta de conformidad con el primer aspecto de la invención, es decir que tiene uno o los dos de los QTL de interés, de manera homocigota en su genoma. Estas partes vegetales, entre otras explante, púa, corte, semilla, fruto, raíz, patrón para injerto, polen, óvulo, embrión, protoplasto, hoja, antera, tallo o peciolo, comprenden en su genoma los QTL que confieren el fenotipo de interés cuando están presentes de manera homocigota, es decir tolerancia de fruto y/o foliar a TBRFV.

Los QTL a los que se hace referencia en este aspecto de la invención son aquellos definidos anteriormente en el contexto de plantas de la invención. Las diferentes características de los QTL definidas con relación al primer aspecto de la invención aplican *mutatis mutandis* a este aspecto de la invención. Por lo tanto, los QTL se eligen a partir de aquellos presentes en el genoma de una planta correspondiente al material depositado HAZTBRFVRES1 (número de accesión NCIMB 42758). Estos son caracterizados de manera conveniente por la presencia del alelo G de TO-0180955, alelo C de TO-0196724, alelo G de TO-0145125, alelo G de TO-0196109, alelo T de TO-0122252, alelo C de TO-0144317, alelo T de TO-0142270, alelo G de TO-0142294, alelo A de TO-0142303, alelo A de TO-0142306, alelo G de TO-0182276, alelo G de TO-0181040, alelo G de TO-0123057, alelo A de TO-0125528, alelo C de TO-0162432 y/o alelo T de TO-0162427, dependiendo del QTL de interés, y de preferencia por la presencia de éste o estos alelos de manera homocigota, específicamente la presencia de los dos alelos G de TO-0180955, de los dos alelos C de TO-0196724, de los dos alelos G de TO-0145125, de los dos alelos G de TO-0196109, de los dos alelos T de TO-0122252, de los dos alelos C de TO-0144317, de los dos alelos T de TO-0142270, de los dos alelos G de TO-0142294, de los dos alelos A de TO-0142303, de los dos alelos A de TO-0142306, de los dos alelos G de TO-0182276, de los dos alelos G de TO-0181040, de los dos alelos G de TO-0123057, de los dos alelos A de TO-0125528, de los dos alelos C de TO-0162432 y/o de los dos alelos T de TO-0162427.

La invención también está dirigida a células de plantas de *S. lycopersicum*, de modo que estas células comprenden, en su genoma, los QTL de la presente invención que confieren el fenotipo de interés a una planta de *S. lycopersicum* de manera homocigota. Los QTL son aquellos ya definidos en el marco de la presente invención, éstos se caracterizan por las mismas características y modalidades preferidas ya descritas con respecto a las plantas y semillas de conformidad con los aspectos precedentes de la invención. La presencia de estos QTL puede ser revelada mediante las técnicas descritas anteriormente y bien conocidas por el experto lector. Se puede determinar, entre otras cosas, si los QTL están presentes de manera homocigota o heterocigota en el genoma de dicha célula de la invención. Estos se caracterizan de manera conveniente por la presencia del alelo G de TO-0180955, alelo C de TO-0196724, alelo G de TO-0145125, alelo G de TO-0196109, alelo T de TO-0122252, alelo C de TO-0144317,

alelo T de TO-0142270, alelo G de TO-0142294, alelo A de TO-0142303, alelo A de TO-0142306, alelo G de TO-0182276, alelo G de TO-0181040, alelo G de TO-0123057, alelo A de TO-0125528, alelo C de TO-0162432 y/o alelo T de TO-0162427, dependiendo del QTL de interés, y de preferencia por la presencia de éste o estos alelos simultáneamente en cada cromosoma, es decir de manera homocigota.

5 Las células de conformidad con la invención pueden ser cualquier tipo de célula de *S. lycopersicum*, entre otras una célula aislada y/o una célula capaz de regenerar una planta entera de *S. lycopersicum*, que tiene los QTL de interés.

10 La presente invención también está dirigida a un cultivo de tejidos de células no regenerables o regenerables de la planta como se definió anteriormente de conformidad con la presente invención; de preferencia, las células regenerables se derivan de embriones, protoplastos, células meristemáticas, callo, polen, hojas, anteras, tallos, peciolo, raíces, ápices radicales, frutos, semillas, flores, cotiledones, y/o hipocotilos de la invención, y las células contienen uno o los dos de los QTL de interés, de manera homocigota en su genoma que confieren, cuando están presentes de manera homocigota el fenotipo mejorado, específicamente tolerancia de fruto a TBRFV para QTL2, 15 tolerancia foliar a TBRFV para QTL3.

El cultivo de tejidos de preferencia será capaz de regenerar plantas que tienen las características fisiológicas y morfológicas de la planta de jitomate anterior, y de regenerar plantas que tienen sustancialmente el mismo genotipo que el de la planta de jitomate anterior. La presente invención también provee plantas de jitomate regeneradas a 20 partir de los cultivos de tejidos de la invención.

La invención también provee un protoplasto de la planta definida anteriormente, o del cultivo de tejidos definido anteriormente, dicho protoplasto contiene los QTL que confieren el fenotipo mejorado de la invención.

25 De conformidad con otro aspecto no reivindicado, la presente divulgación también describe el uso de una planta de jitomate de la invención, que comprende, de manera homocigota los QTL de la invención, como un compañero de cruza en un programa de fitomejoramiento para obtener plantas de *S. lycopersicum* que tienen el fenotipo mejorado de la invención. En efecto, dicho compañero de cruza aloja de manera homocigota en su genoma los QTL que confieren el fenotipo de interés. Mediante cruza de esta planta con una planta de jitomate, especialmente una línea, 30 es posible por lo tanto transferir uno, dos o los tres QTL de la presente invención que confieren el fenotipo deseado, a la progenie. Una planta de conformidad con la invención se puede utilizar, por lo tanto, como un compañero de cruza para introgresar los QTL que confieren el fenotipo deseado en una planta o germoplasma de *S. lycopersicum*, de preferencia para transferir el QTL responsable de la resistencia foliar.

35 El fenotipo mejorado de la invención es tolerancia a TBRFV, entre otras tolerancia foliar o tolerancia de fruto, o combinación de tolerancia de fruto y foliar.

De manera conveniente, los QTL introgresados se van a introducir en variedades que contienen otros rasgos genéticos deseables tal como resistencia a enfermedad, maduración temprana del fruto, tolerancia a la sequía, 40 forma del fruto, y similares.

En dicho programa de fitomejoramiento, la selección de la progenie que muestra el fenotipo deseado, o que tiene los QTL ligados al fenotipo deseado, se puede llevar a cabo de manera conveniente con base en los alelos de los marcadores de SNP, especialmente los marcadores de SNP de la invención.

45 Una progenie de la planta de preferencia se selecciona sobre la presencia del alelo G de TO-0180955, alelo C de TO-0196724, alelo G de TO-0145125 y/o alelo G de TO-0196109 para la presencia de QTL2 en el cromosoma 9, alelo T de TO-0122252, alelo C de TO-0144317, alelo T de TO-0142270, alelo G de TO-0142294, alelo A de TO-0142303, alelo A de TO-0142306, alelo G de TO-0182276, alelo G de TO-0181040, alelo G de TO-0123057, alelo A de TO-0125528, alelo C de TO-0162432 y/o alelo T de TO-0162427 para la presencia de QTL3 en el cromosoma 11. Según la naturaleza recesiva de los QTL, la progenie de la planta de preferencia se selecciona sobre la presencia del mismo alelo en ambos homólogos de cada cromosoma.

50 De manera alternativa la selección se puede hacer tomando como base la presencia de cualquiera de los alelos de los 18 SNP vinculados al fenotipo mejorado o una combinación de estos alelos. Dicha selección se hará sobre la presencia de los alelos de interés en una muestra de material genético de la planta que se va a seleccionar. La presencia de estos alelos confirma en efecto la presencia de los QTL de la invención en los loci definidos por dichos SNP. Asimismo, además de la mutación de punto o evento de recombinación, es concebible que se pierda por lo menos 1 o 2 de estos alelos, el resto del fragmento cromosómico que tiene los QTL de interés sigue confiriendo el 60 fenotipo de interés.

Una planta de conformidad con la invención, o cultivada a partir de una semilla como la depositada bajo el número de accesión NCIMB 42758, es por lo tanto particularmente valiosa en una selección asistida con marcador para obtener líneas y variedades de jitomate comerciales, que tienen el fenotipo mejorado de la invención.

65 La invención también está dirigida al uso de dichas plantas en un programa dirigido a identificar, secuenciar y/o

clonar las secuencias genéticas que confieren el fenotipo deseado.

Cualquier modalidad específica descrita para los aspectos previos de la invención también es aplicable a este aspecto de la invención, especialmente con respecto a las características de los QTL que confieren el fenotipo de interés.

La invención también está dirigida a un método para identificar, detectar y/o seleccionar plantas de *S. lycopersicum* que tienen el QTL3 de la presente invención como se encuentra en el genoma de las semillas de HAZTBRFVRES1 (número de accesión NCIMB 42758), dicho QTL que confiere tolerancia y/o resistencia foliar al virus del fruto rugoso café del jitomate con respecto a una planta correspondiente carente de dichas secuencias, el método comprende la detección de por lo menos uno de los siguientes marcadores: alelo T de TO-0122252, alelo C de TO-0144317, alelo T de TO-0142270, alelo G de TO-0142294, alelo A de TO-0142303, alelo A de TO-0142306, alelo G de TO-0182276, alelo G de TO-0181040, alelo G de TO-0123057, alelo A de TO-0125528, alelo C de TO-0162432 o alelo T de TO-0162427 en una muestra de material genético de la planta que se va a identificar y o seleccionar.

La invención también está dirigida a un método para detectar o seleccionar plantas de *S. lycopersicum* que tienen el QTL que confiere resistencia a TBRFV solamente cuando está presente de manera homocigota y que tiene por lo menos uno de los siguientes alelos: alelo T de TO-0122252, alelo C de TO-0144317, alelo T de TO-0142270, alelo G de TO-0142294, alelo A de TO-0142303, alelo A de TO-0142306, alelo G de TO-0182276, alelo G de TO-0181040, alelo G de TO-0123057, alelo A de TO-0125528, alelo C de TO-0162432 o alelo T de TO-0162427), en el cual la detección o selección se hace en condición de infección por TBRFV que comprende inoculación de TBRFV en las plantas a ser examinadas. De conformidad con una modalidad preferida, el método es para detectar o seleccionar plantas de *S. lycopersicum* que tienen un QTL que confiere resistencia o tolerancia foliar a TBRFV solamente cuando está presente de manera homocigota y que tienen el alelo G de TO-0182276, en el cual la detección o selección se hace en condiciones de infección por TBRFV que comprende inoculación de TBRFV en las hojas de las plantas a ser examinadas.

El método está particularmente adaptado en un programa de fitomejoramiento con HAZTBRFVRES1 (número de accesión NCIMB 42758), como progenitor inicial, o progenie del mismo, que comprende los QTL de la invención que confieren resistencia, en el cual la detección y/o selección se hace en condiciones que comprenden infestación por TBRFV y en el cual dichas secuencias introgradadas confieren resistencia o tolerancia a TBRFV y tienen por lo menos uno de los siguientes marcadores: alelo T de TO-0122252, alelo C de TO-0144317, alelo T de TO-0142270, alelo G de TO-0142294, alelo A de TO-0142303, alelo A de TO-0142306, alelo G de TO-0182276, alelo G de TO-0181040, alelo G de TO-0123057, alelo A de TO-0125528, alelo C de TO-0162432 o alelo T de TO-0162427, y de manera más preferida alelo G de TO-0182276.

Una planta será seleccionada respecto a la presencia de QTL3 si se detectan por lo menos uno o dos, o tres o cuatro o cinco o más de los siguientes alelos: alelo T de TO-0122252, alelo C de TO-0144317, alelo T de TO-0142270, alelo G de TO-0142294, alelo A de TO-0142303, alelo A de TO-0142306, alelo G de TO-0182276, alelo G de TO-0181040, alelo G de TO-0123057, alelo A de TO-0125528, alelo C de TO-0162432 y alelo T de TO-0162427.

Las plantas también serán detectadas cuando tengan combinación de los alelos de la presente invención. Una planta será seleccionada respecto a la presencia de QTL2 y QTL3 si se detectan por lo menos uno o dos, o tres o cuatro de los siguientes alelos: alelo G de TO-0180955, alelo C de TO-0196724, alelo G de TO-0145125, alelo G de TO-0196109, así como si se detectan por lo menos uno o dos, o tres o cuatro o cinco o más de los siguientes alelos: alelo T de TO-0122252, alelo C de TO-0144317, alelo T de TO-0142270, alelo G de TO-0142294, alelo A de TO-0142303, alelo A de TO-0142306, alelo G de TO-0182276, alelo G de TO-0181040, alelo G de TO-0123057, alelo A de TO-0125528, alelo C de TO-0162432 y alelo T de TO-0162427.

En todos los aspectos de la invención previamente descritos, una tolerancia a TBRFV preferida es tolerancia foliar. Los SNP preferidos son TO-0142294, TO-0142303, TO-0142306, TO-0182276, TO-0181040, TO-0123057 y TO-0125528, y de manera incluso más preferida TO-0182276, con respecto a todos los aspectos de la invención.

La descripción también está dirigida, en una modalidad no reivindicada, a un método para detectar y o seleccionar plantas de *S. lycopersicum* que tienen por lo menos uno de los QTL de la presente invención que confieren el fenotipo mejorado, basado en la detección de cualquier marcador molecular que revele la presencia de dichos QTL. En efecto, ahora que los QTL han sido identificados por los presentes inventores, el experto en la técnica puede hacer la identificación y después el uso de marcadores moleculares, además de los 18 SNP conforme divulgado. Los QTL por si mismos seguirán siendo caracterizados por la presencia de por lo menos uno de los 18 SNP conforme divulgado, pero éstos también serán identificados a través del uso de marcadores alternativos, diferentes. Los métodos y usos de cualesquiera de dichos marcadores moleculares para identificar los QTL de la invención en un genoma de jitomate, en el cual dicho QTL confiere tolerancia foliar y/o de fruto a TBRFV con respecto a una planta correspondiente carente de dichos QTL en la cual dichos QTL son caracterizados por la presencia de por lo menos uno de los siguientes SNP: TO-0005197, TO-0145581, TO-0180955, TO-0196724, TO-0145125, TO-0196109, TO-0122252, TO-0144317, TO-0142270, TO-0142294, TO-0142303, TO-0142306, TO-0182276, TO-0181040, TO-0123057, TO-0125528, TO-0162432 y TO-0162427, están incluidos en la presente divulgación.

De conformidad incluso con otro aspecto no reivindicado, la descripción también se refiere a métodos o procesos para la producción de plantas de *S. lycopersicum* que tienen el fenotipo deseado, especialmente plantas comerciales y líneas progenitoras endógamas. En efecto, la presente descripción también está dirigida a transferir uno o los dos QTL de la invención que confieren el fenotipo mejorado como se definió, a otras variedades de jitomate, u otras especies o líneas progenitoras endógamas, y es útil para producir nuevos tipos y variedades de jitomates.

Un método o proceso para la producción de una planta que tenga estas características puede comprender los siguientes pasos:

- a) Cruzar una planta cultivada a partir de una semilla NCIMB 42758 depositada, o progenie de la misma, que tiene QTL2 y/o QTL3 que confieren tolerancia a TBRFV, y una planta inicial de *S. lycopersicum*, de preferencia carente de dicho(s) QTL,
- b) Seleccionar una planta en la progenie obtenida de esta manera, que tiene uno o los dos de los QTL2 y/o QTL3 de la presente invención;
- c) Opcionalmente auto-polinizar una o varias veces la planta obtenida en el paso b) y seleccionar en la progenie obtenida de esta manera una planta que tiene tolerancia a TBRFV, ya sea una tolerancia de fruto, una tolerancia foliar o ambas, dependiendo del o los QTL presente(s) en la planta de progenie.

De manera alternativa, el método o proceso puede comprender en lugar del paso a) los siguientes pasos:

- a1) Cruzar una planta correspondiente a las semillas depositadas (NCIMB 42758), o progenie de la misma, que tiene QTL2 y/o QTL3 que confieren tolerancia a TBRFV, y una planta inicial de *S. lycopersicum*, de preferencia carente de dicho(s) QTL,
- a2) Incrementar el híbrido F1 por medio de auto-fecundación para crear la población F2.

En los métodos o procesos anteriores, de preferencia se utilizan marcadores de los SNP en los pasos b) y/o c), para seleccionar plantas que tienen secuencias que confieren el fenotipo de tolerancia y o resistencia de interés. Los marcadores de SNP de preferencia son uno o más de los 18 marcadores de SNP de la invención, incluyendo todas las combinaciones de los mismos como se menciona en cualquier parte en la presente solicitud.

De conformidad con una modalidad preferida, la selección de una planta que tiene una tolerancia foliar al virus del fruto rugoso café del jitomate se hace sobre la base de TO-0182276, o sobre la base de por lo menos uno de TO-0142294, TO-0142303, TO-0142306, TO-0182276, TO-0181040, TO-0123057, TO-0125528.

Con seleccionar una planta sobre la base del alelo de uno o más SNP, se debe entender que la planta se selecciona como tolerante al TBRFV, ya sea una tolerancia/resistencia de fruto, una tolerancia/resistencia foliar o ambas con respecto a la planta inicial, cuando el alelo del o los SNP es/son el alelo correspondiente al alelo del progenitor HAZTBRFVRES1 para este SNP y no el alelo de la planta de *S. lycopersicum* inicial. Por ejemplo, se puede seleccionar una planta en el sentido que tiene el fenotipo mejorado de la invención, cuando se detecta el alelo G de TO-0180955, el alelo C de TO-0196724, el alelo G de TO-0145125, el alelo G de TO-0196109, el alelo T de TO-0122252, el alelo C de TO-0144317, el alelo T de TO-0142270, el alelo G de TO-0142294, el alelo A de TO-0142303, el alelo A de TO-0142306, el alelo G de TO-0182276, el alelo G de TO-0181040, el alelo G de TO-0123057, el alelo A de TO-0125528, el alelo C de TO-0162432 y/o el alelo T de TO-0162427.

De preferencia, la planta de *S. lycopersicum* del paso a) es una línea de élite, utilizada para obtener una planta con rasgos comercialmente deseados o rasgos hortícolas deseados.

Un método o proceso como se definió anteriormente puede comprender de manera conveniente pasos de retrocruza, de preferencia después del paso c), para obtener plantas que tienen todos los elementos de caracterización de las plantas de *S. lycopersicum*. Por consiguiente, un método o proceso para la producción de una planta que tenga estas características también puede comprender los siguientes pasos adicionales:

- d) Someter a retrocruza la planta resistente seleccionada en el paso b) o en el paso c) con una planta de *S. lycopersicum*;
- e) Seleccionar una planta que tiene uno o dos de los QTL2 y/o QTL3 de la presente invención con respecto a la planta inicial.

La planta utilizada en el paso a), específicamente la planta correspondiente a las semillas depositadas puede ser una planta cultivada a partir de las semillas depositadas; alternativamente, ésta puede ser cualquier planta de conformidad con el primer aspecto de la invención, que tiene los QTL que confieren el fenotipo de manera homocigota.

En el paso e), se pueden utilizar marcadores de SNP para seleccionar plantas que tienen una tolerancia y/o resistencia foliar al virus del fruto rugoso café del jitomate, con respecto a la planta inicial. Los marcadores de SNP son aquellos de la invención, como se describió en las secciones previas.

- De conformidad con una modalidad preferida, el método o proceso de la invención se lleva a cabo de modo que, para por lo menos uno de los pasos de selección, específicamente b), c) y/o e), la selección se basa en la detección de por lo menos uno de los siguientes alelos: alelo G de TO-0180955, alelo C de TO-0196724, alelo G de TO-0145125, alelo G de TO-0196109, alelo T de TO-0122252, alelo C de TO-0144317, alelo T de TO-0142270, alelo G de TO-0142294, alelo A de TO-0142303, alelo A de TO-0142306, alelo G de TO-0182276, alelo G de TO-0181040, alelo G de TO-0123057, alelo A de TO-0125528, alelo C de TO-0162432 y/o alelo T de TO-0162427.
- Se debe indicar que, cuando las plantas que tienen el fenotipo mejorado, y que tienen de manera homocigota uno o más de los QTL que confieren este fenotipo, se van a seleccionar, la selección se debe hacer sobre la base de uno o más de los SNP de la invención, sobre la presencia de los alelos representativos de los QTL, específicamente los alelos de HAZTBFRVRES1 progenitor, acoplado a la ausencia de los alelos representativos del progenitor recurrente de *S. lycopersicum*.
- La planta seleccionada en el paso e) de preferencia es una planta comercial, especialmente una planta que tiene frutos que pesan por lo menos 25 g, por lo menos 100 g o por lo menos 200 g en plena madurez en condiciones de cultivo normales. De preferencia, los pasos d) y e) se repiten por lo menos dos veces y de preferencia tres veces, no necesariamente con la misma planta de *S. lycopersicum*. Dicha planta de *S. lycopersicum* de preferencia es una línea de reproducción.
- De manera adicional se puede seleccionar el rasgo de resistencia a nemátodos o resistencia a ToMV, en cada paso de selección de los procesos descritos anteriormente.
- Los pasos de auto-polinización y retrocruza se pueden llevar a cabo en cualquier orden y se pueden intercalar, por ejemplo se puede llevar a cabo una retrocruza antes y después de una o varias auto-polinizaciones, y las auto-polinizaciones se pueden contemplar antes y después de una o varias retrocruzas.
- La selección de la progenie que tiene el fenotipo mejorado deseado también se puede hacer sobre la base de la comparación de resistencia al virus del fruto rugoso café del jitomate proveniente del *S. lycopersicum* progenitor, a través de protocolos como los descritos entre otras cosas en los ejemplos; la resistencia/tolerancia examinada puede ser cualquiera de resistencia/tolerancia de fruto o resistencia/tolerancia foliar, o ambas.
- El método utilizado para detección de alelo puede estar basado en cualquier técnica que permita la distinción entre dos alelos diferentes de un SNP, en un cromosoma específico.
- La descripción también está dirigida en un aspecto no reivindicado, a un método para obtener plantas comerciales de jitomate o líneas progenitoras endógamas de las mismas, que tienen el fenotipo mejorado deseado, correspondiente a una tolerancia y/o resistencia de fruto y/o foliar al virus del fruto rugoso café del jitomate, con respecto a una planta de *S. lycopersicum* comercial inicial, que comprende los pasos de:
- Someter a retrocruza una planta obtenida mediante germinación de una semilla depositada HAZTBFRVRES1 número de accesión NCIMB 42758, o progenie de la misma, que tiene QTL2 y/o QTL3 que confieren tolerancia a TBRFV, con una planta de *S. lycopersicum* commercial,
 - Seleccionar una planta que tiene uno o dos de los QTL2 y/o QTL3 de la presente invención.
- De preferencia, la selección se hace sobre la base de uno o más de los 18 SNP, como se detalló para los otros métodos de la invención.
- En todos los métodos y procesos, la planta de *S. lycopersicum* inicial es determinada, indeterminada o semi-determinada.
- Como se describió anteriormente, las plantas de jitomate de conformidad con la invención de preferencia también son resistentes al virus del mosaico del jitomate, a nemátodos, y a Fusarium y Verticillium. Con el fin de obtener dichas plantas en los procesos y métodos de la invención, los progenitores de *S. lycopersicum* utilizados en los esquemas de fitomejoramiento de preferencia son secuencias portadoras que confieren resistencia al virus del mosaico del jitomate, a nemátodos, y a Fusarium y Verticillium; y los pasos de selección se llevan a cabo para seleccionar plantas que tengan estas secuencias de resistencia, además del o los QTL que confieren el fenotipo mejorado de la invención.
- La presente invención también está dirigida a una planta y semilla de *S. lycopersicum* que se pueden obtener mediante cualquiera de los métodos y procesos descritos anteriormente. Las semillas de dicho *S. lycopersicum* de preferencia están revestidas o convertidas en pellas con especies activas individuales o combinadas tales como nutrientes vegetales, microorganismos potenciadores, o productos para desinfectar el entorno de las semillas y plantas. Dichas especies y productos químicos pueden ser un producto que promueva el crecimiento de las plantas, por ejemplo hormonas, o que incremente su resistencia a las tensiones ambientales, por ejemplo estimuladores de defensa, o que establezca el pH del sustrato y sus alrededores inmediatos, o de manera alternativa un nutriente.

Estos también pueden ser un producto para proteger contra agentes que son desfavorables hacia el crecimiento de plantas jóvenes, incluyendo en la presente solicitud virus y microorganismos patógenos, por ejemplo un producto fungicida, bactericida, hemático, insecticida o herbicida, el cual actúa por contacto, ingestión o difusión gaseosa; éste es, por ejemplo, cualquier aceite esencial apropiado, por ejemplo extracto de tomillo. Todos estos productos refuerzan las reacciones de resistencia de la planta, y/o desinfectan o regulan el entorno de dicha planta. Éstos también pueden ser un material biológico vivo, por ejemplo un microorganismo no patógeno, por ejemplo por lo menos un hongo, o una bacteria, o un virus, si fuera necesario con un medio que asegure su viabilidad; y este microorganismo, por ejemplo del tipo *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Trichoderma*, *Clonostachys*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, etc. estimula el crecimiento de la planta, o la protege contra patógenos.

En todos los métodos y procesos previos, la identificación de las plantas que tienen de manera homocigota los QTL responsables de la tolerancia de fruto y/o foliar al TBRFV se puede hacer mediante la detección de por lo menos uno de los alelos ligados con cada uno de los QTL, pero también en combinación con la ausencia de la otra forma alélica de los SNP de la presente invención. Por lo tanto, la identificación de una planta que tiene de manera homocigota QTL2 de la presente invención estará basada en la identificación del alelo G de TO-0180955 y/o del alelo C de TO-0196724 y/o del alelo G de TO-0145125 y/o del alelo G de TO-0196109 así como la ausencia de A de TO-0180955, alelo T de TO-0196724, alelo A de TO-0145125 y alelo T de TO-0196109. De manera similar, la identificación de una planta que tiene de manera homocigota QTL3 de la presente invención estará basada en la identificación del alelo T de TO-0122252, y/o del alelo C de TO-0144317, y/o del alelo T de TO-0142270, y/o del alelo G de TO-0142294, y/o del alelo A de TO-0142303, y/o del alelo A de TO-0142306, y/o del alelo G de TO-0182276, y/o del alelo G de TO-0181040, y/o del alelo G de TO-0123057, y/o del alelo A de TO-0125528, y/o del alelo C de TO-0162432 y/o del alelo T de TO-0162427 así como la ausencia del alelo A de TO-0122252, alelo T de TO-0144317, alelo C de TO-0142270, alelo A de TO-0142294, alelo C de TO-0142303, alelo G de TO-0142306, alelo A de TO-0182276, alelo A de TO-0181040, alelo T de TO-0123057, alelo G de TO-0125528, alelo T de TO-0162432 y alelo C de TO-0162427.

La invención también está dirigida al uso de la información provista con la presente solicitud por los presentes inventores, específicamente la existencia de 3 QTL, presentes en las semillas depositadas de HAZTBRFVRES1, y que confieren el fenotipo mejorado a plantas de *S. lycopersicum*, y la divulgación de marcadores moleculares asociados con estos QTL. Este conocimiento se puede utilizar entre otras cosas para mapear de manera precisa los QTL, para definir sus secuencias, para identificar plantas de jitomate que comprenden los QTL que confieren el fenotipo mejorado y para identificar marcadores adicionales o alternativos asociados con estos QTL. Dichos marcadores adicionales se caracterizan por su ubicación, específicamente cercanos a los 18 marcadores descritos en la presente invención, y de preferencia a partir de los 12 SNP en el cromosoma 11, y por su asociación con el fenotipo de interés, revelado por la invención, específicamente tolerancia a TBRFV, ya sea tolerancia foliar, o tolerancia de fruto, o ambas.

Con asociación, o asociación genética, y de manera más específica vinculación genética, se debe entender que un polimorfismo genético del marcador (es decir un alelo específico del marcador de SNP) y el fenotipo de interés ocurren simultáneamente, es decir se heredan juntos, con mayor frecuencia de lo esperado por ocurrencia casual, es decir existe una asociación no aleatoria del alelo y de las secuencias genéticas responsables del fenotipo, como resultado de su proximidad en el mismo cromosoma.

Un marcador molecular de la invención, cualquiera de los 18 marcadores descritos anteriormente o marcadores alternativos, se heredan con el fenotipo de interés de preferencia en más de 90% de las meiosis, de preferencia en más de 95%, 96%, 98% o 99% de las meiosis.

De conformidad incluso con otro aspecto, la invención también está dirigida a un método para determinar el genotipo de una planta, de preferencia una planta de *S. lycopersicum* o germoplasma de jitomate, para la presencia de por lo menos un marcador genético asociado con resistencia o tolerancia a infección por TBRFV, en el cual el método comprende la determinación o detección en el genoma de la planta examinada de un ácido nucleico que comprende por lo menos uno de los marcadores de la invención. De preferencia, el método comprende el paso de identificar en una muestra de la planta que se va a examinar secuencias específicas asociadas con resistencia/tolerancia a TBRFV, en ácido nucleico que comprende el alelo T de TO-0122252, alelo C de TO-0144317, alelo T de TO-0142270, alelo G de TO-0142294, alelo A de TO-0142303, alelo A de TO-0142306, alelo G de TO-0182276, alelo G de TO-0181040, alelo G de TO-0123057, alelo A de TO-0125528, alelo C de TO-0162432 y/o alelo T de TO-0162427.

De conformidad con una modalidad más preferida de este método, el método comprende la detección en la planta examinada de la presencia de ácido nucleico que comprende alelo G de TO-0182276.

La detección de un alelo específico de un SNP se puede llevar a cabo mediante cualquier método bien conocido por el experto lector.

En vista de la capacidad de las plantas resistentes de la invención para restringir los daños causados por infección por TBRFV, éstas de manera conveniente se cultivan en un ambiente infestado o con probabilidad de ser infestado o

infectado por TBRFV; en estas condiciones, las plantas resistentes o tolerantes de la invención producen más jitomates comercializables que las plantas susceptibles. La invención por lo tanto también está dirigida a un método para mejorar el rendimiento de plantas de jitomate en un ambiente infestado por TBRFV que comprende cultivar plantas de jitomate que comprenden de manera homocigota en su genoma el QTL3 en el cromosoma 11, como se definió de conformidad con los aspectos previos de la invención, y que confieren a dichas plantas resistencia o tolerancia a TBRFV. El método comprende un primer paso de elegir o seleccionar una planta de jitomate que tiene de manera homocigota el QTL3 detectando al menos uno de los siguientes marcadores: alelo T de TO-0122252, alelo C de TO-0144317, alelo T de TO-0142270, alelo G de TO-0142294, alelo A de TO-0142303, alelo A de TO-0142306, alelo G de TO-0182276, alelo G de TO-0181040, alelo G de TO-0123057, alelo A de TO-0125528, alelo C de TO-0162432 y alelo T de TO-0162427 en una muestra de material genético de la planta. El método también puede ser definido como un método para incrementar la productividad de un campo, túnel o invernadero de jitomates.

La invención también está dirigida a un método para reducir la pérdida en la producción de jitomate en condición de infestación o infección por TBRFV, que comprende cultivar una planta de jitomate como se definió anteriormente.

Estos métodos son particularmente valiosos para una población de plantas de jitomate, ya sea en un campo, en túneles o en invernaderos.

Dichos métodos para mejorar el rendimiento o reducir las pérdidas en la producción de jitomate comprenden un primer paso de identificar plantas de jitomate resistentes/tolerantes a TBRFV y que comprenden en su genoma el QTL en el cromosoma 11 que confiere a dichas plantas una resistencia o tolerancia a dicho TBRFV, y después cultivar dichas plantas resistentes o tolerantes en un ambiente infestado o con probabilidad de ser infestado por el virus. De conformidad con una modalidad preferida, las plantas que se van a identificar en el primer paso comprenden el alelo G de TO-0182276.

Las plantas resistentes de la invención también son capaces de restringir el crecimiento de TBRFV, limitando por lo tanto la infección de otras plantas y la propagación del virus. Por consiguiente, la invención también está dirigida a un método para proteger un campo, túnel o invernadero, o cualquier otro tipo de plantación, contra la infestación por TBRFV, o de por lo menos limitar el nivel de infestación por TBRFV de dicho campo, túnel o invernadero o de limitar la diseminación de TBRFV en un campo, túnel o invernadero, especialmente en un campo de jitomates. Dicho método de preferencia comprende el paso de cultivar una planta resistente o tolerante de la invención, es decir una planta que comprende de manera homocigota en su genoma QTL3 en el cromosoma 11, que confiere a dicha planta una resistencia o tolerancia a TBRFV. La planta de la invención que se va a utilizar de preferencia exhibe el alelo G de TO-0182276.

El método comprende un primer paso de elegir o seleccionar una planta de jitomate que tiene de manera homocigota los QTL de interés, especialmente QTL3 en el cromosoma 11 detectando al menos uno de los siguientes marcadores: alelo T de TO-0122252, alelo C de TO-0144317, alelo T de TO-0142270, alelo G de TO-0142294, alelo A de TO-0142303, alelo A de TO-0142306, alelo G de TO-0182276, alelo G de TO-0181040, alelo G de TO-0123057, alelo A de TO-0125528, alelo C de TO-0162432 y alelo T de TO-0162427 en una muestra de material genético de las plantas.

La invención también se refiere al uso de una planta resistente o tolerante a TBRFV para controlar la infección o infestación por TBRFV en un campo, túnel o invernadero, u otra plantación; dicha planta es una planta de la invención, que comprende de manera homocigota en su genoma por lo menos uno de QTL1, QTL2, y/o QTL3 como se definió anteriormente, en los cromosomas 6, 9 y 11 respectivamente. De conformidad con este uso, las plantas de la invención se utilizan por lo tanto para proteger un campo, túnel o invernadero contra infestación por TBRFV. Las plantas de la invención que se van a utilizar de preferencia comprenden QTL3 en el cromosoma 11; de manera más preferida éstas exhiben el alelo G de TO-0182276.

Leyenda de las figuras

Figura 1: Gráfica del valor p del QTL asociado a resistencia del fruto a TBRFV tomando como base la población F2 de HAZ1x HAZ2.

Esta figura es la gráfica Manhattan que muestra los resultados del mapeo de la población de mapeo bi-parental (HAZ1 x HAZ2, véase ejemplo 4) con respecto a la tolerancia y/o resistencia del fruto al virus del fruto rugoso café del jitomate. El eje vertical (eje de las "y") muestra el -log₁₀ (valor p) y el eje horizontal (eje de las "x") representa todos los SNP mediante sus posiciones (distancias físicas en pb) por los cromosomas a lo largo del mapa físico.

Figura 2: Gráfica del valor p del QTL asociado a resistencia foliar a TBRFV tomando como base la población F2 de HAZ1 x HAZ2.

Esta figura es la gráfica Manhattan que muestra los resultados del mapeo de la población de mapeo bi-parental (HAZ1 x HAZ2, véase ejemplo 4) con respecto a la tolerancia y/o resistencia foliar al virus del fruto rugoso café del jitomate. El eje vertical (eje de las "y") muestra el -log₁₀ (valor p) y el eje horizontal (eje de las "x") representa todos los SNP mediante sus posiciones (distancias físicas en pb) por los cromosomas a lo largo del mapa físico.

Figura 3: Gráfica del valor p del QTL asociado a resistencia foliar a TBRFV tomando como base la población F2 de HAZ3 x HAZ4.

Esta figura es la gráfica Manhattan que muestra los resultados del mapeo de la población de mapeo bi-parental (HAZ3 x HAZ4, véase ejemplo 6) con respecto a la tolerancia y/o resistencia foliar al virus del fruto rugoso café del jitomate. El eje vertical (eje de las "y") muestra el $-\log_{10}$ (valor p) y el eje horizontal (eje de las "x") representa todos los SNP mediante sus posiciones (en distancias físicas pb) por los cromosomas a lo largo del mapa físico.

Ejemplos

EJEMPLO 1

Recolección e identificación del virus del fruto rugoso café del jitomate

Los presentes inventores han hecho una recolección de diferentes aislados a partir de diferentes áreas de producción israelíes (Norte, Centro y Sur de Israel) infectadas por el virus del fruto rugoso café del jitomate: se recolectaron 7 aislados diferentes y se analizaron de conformidad con los protocolos descritos en Salem et al. Las comparaciones de las secuencias con el virus del fruto rugoso café del jitomate jordano mostraron que todos los aislados israelíes son idénticos al jordano, confirmando que el mismo virus está presente en ambos países.

EJEMPLO 2

Identificación de resistencia

Los inventores someten a tamizaje su material genético de fitomejoramiento de jitomate en un invernadero infectado de manera natural en la parte sur de Israel, en la región de Bsor, la cual es la principal área de producción de cultivo de jitomate en Israel. Se tamizaron aproximadamente 443 jitomates diferentes. Cada jitomate se plantó en dos repeticiones, 10 plantas por repetición en diferentes ubicaciones en el invernadero.

Cada hilera en el invernadero contiene 120 plantas. En cada hilera, se planta un control de 10 plantas de una línea susceptible. Para diseminar los controles en los diferentes lugares en el invernadero, los controles se posicionan en diagonal a lo largo de las diferentes hileras en el invernadero.

En este tamizaje, unos cuantos jitomates no muestran síntomas foliares de TBRFV y muy pocos síntomas de fruto. De estos, se eligen dos jitomates asintomáticos y dos jitomates susceptibles para la siguiente etapa.

Los resultados de estos experimentos se muestran en la tabla no. 1. Los 2 jitomates susceptibles que se han elegido son representativos de los 441 jitomates susceptibles en el sentido que éstos son considerados susceptibles al virus del fruto rugoso café del jitomate.

Hazera no. 1 (o HAZ1) es un jitomate indeterminado del tipo suelto con frutos regulares, redondos y de color rojo oscuro de aproximadamente 170 gr. La planta tiene un follaje verde oscuro y es resistente a *Verticillium dahlia*, *Meloidogyne incognita*, virus del rizado foliar amarillo del jitomate y *Stemphylium solani*.

Hazera no. 2 (o HAZ2) es un jitomate indeterminado del tipo carne de res con frutos regulares e intermedios planos, de color rojo oscuro intenso de aproximadamente 280 gr. La planta es resistente a *Verticillium dahlia*, *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* 1,2, virus del mosaico del jitomate, *Fulvia fulva*, *Meloidogyne incognita*, virus de la marchitez moteada del jitomate.

Hazera no. 3 (o HAZ3) es un jitomate indeterminado del tipo carne de res con frutos intermedios planos de color rojo de aproximadamente 270gr. La planta es resistente a virus de la marchitez moteada del jitomate, *Verticillium dahlia*, *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* 1,2 y *Stemphylium solani*.

Hazera no. 4 (o HAZ4) es un jitomate indeterminado del tipo minicarne de res con frutos redondos de color rojo de aproximadamente 180gr. La planta es resistente al virus del mosaico del tabaco, virus del rizado foliar amarillo del jitomate, *Cladosporium fulvum* (CF9), *Verticillium dahlia* y *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* 1,2.

TABLA 1 Plantas examinadas para resistencia a TBRFV

Jitomate	Número total de plantas	Número de plantas sin síntomas de TBRFV foliar y en fruto	Número de plantas con síntomas significativos de TBRFV foliar y en fruto	Conclusión
Hazera no. 1	20	20	0	Tolerante/Resistente
Hazera no. 2	20	0	20	Susceptible
Hazera no. 3	20	20	0	Tolerante/Resistente
Hazera no. 4	20	0	20	Susceptible

EJEMPLO 3**5 Confirmación de resistencia**

Para entender mejor la genética subyacente al fenotipo de tolerancia/resistencia así como para validar los líderes identificados durante el primer tamizaje, los presentes inventores hacen un segundo tamizaje bajo condiciones similares a las del primer tamizaje: cada hilera en los invernaderos bajo infección natural contiene 120 plantas y en cada hilera, se planta un control susceptible (10 plantas). Para diseminar los controles en los diferentes lugares en el invernadero, los controles se posicionan en diagonal a lo largo de las diferentes hileras en el invernadero.

Además de los jitomates resistentes identificados durante el primer tamizaje, también se incluyen en la prueba sus F1 obtenidos a partir de la cruce de una planta resistente con una línea susceptible, así como sus F2.

La Tabla 2 muestra el resultado del segundo tamizaje con respecto a la evaluación foliar: las plantas se consideran como susceptibles tan pronto como estas tienen algo de mosaico y distorsiones en el ápice de los brotes. Las plantas tolerantes/resistentes no tienen síntomas en el ápice de los brotes.

TABLA 2 Evaluación foliar del segundo tamizaje

Jitomate	Número total de plantas	Número de plantas sin síntomas de TBRFV foliar	Número de plantas con síntomas significativos de TBRFV foliar	Conclusión
Hazera no. 1	20	20	0	Tolerante/Resistente
Hazera no. 2	20	0	20	Susceptible
F1 Hazera no. 1 x Hazera no. 2	20	0	20	Susceptible
F2 Hazera no. 1 x Hazera no. 2	247	60	187	Segregante
Hazera no. 3	20	20	0	Tolerante/Resistente
Hazera no. 4	20	0	20	Susceptible
F1 Hazera no. 3 x Hazera no. 4	20	0	20	Susceptible
F2 Hazera no. 3 x Hazera no. 4	248	63	185	Segregante

Los datos de determinación de fenotipo de las plantas F1 y F2 tienden a demostrar que la tolerancia y/o resistencia foliar al virus del fruto rugoso café del jitomate es controlada en una manera recesiva por un gen o QTL individual.

La Tabla 3 muestra el resultado del segundo tamizaje con respecto a la evaluación del fruto: las plantas se califican en una escala de 1 a 4 con lo cual las plantas con calificaciones de 1 a 3 serán consideradas como susceptibles, teniendo para las plantas calificadas con 1: síntoma grave de lesiones del fruto típicas y algo de deformación del fruto, para las plantas calificadas con 2: lesiones moderadas en algunos de los frutos solamente y las calificadas con tres 3: síntomas ligeros. Solamente las plantas que tienen 3.5 y 4, es decir sin síntomas en los frutos serán consideradas como resistentes.

TABLA 3 Evaluación de fruto del segundo tamizaje

Línea	Número total de plantas	Número de plantas Con una calificación de síntomas en fruto						Conclusión
		1	1.5	2	2.5	3	3.5	
Hazera no. 1	20	0	0	0	0	0	20	Tolerante
Hazera no. 2	20	20	0	0	0	0	0	Susceptible
F2 Haz1 x Haz2	238	101	28	21	12	21	55	Segregante

Los datos de determinación de fenotipo de las plantas F2 tienden a demostrar que la tolerancia y/o resistencia del fruto al virus del fruto rugoso café del jitomate es controlada en una manera recesiva por unos cuantos, uno o dos QTL.

EJEMPLO 4**Asociación y análisis para el mapeo de genes**

- 5 Se utilizan las plantas de jitomate Hazera no. 1 y Hazera no. 2 para construir una población de mapeo bi-parental F2. Se cruza la planta de jitomate Hazera no. 1 que muestra un fenotipo resistente (de fruto y foliar) al virus del fruto rugoso café del jitomate con la planta susceptible con el fin de crear una F1 la cual se utiliza después para generar una población segregante F2. Se desarrolla una población bi-parental adicional utilizada para validación (QTL foliar) tomando como base Hazera no. 3 y Hazera no. 4 de la misma manera (véase ejemplo 6).

10 Extracción de ADN

- 15 Se extrae ADN a partir de hojas que se muelen utilizando el kit para planta NucleoMag® (Macherey-Nagel) de conformidad con los procedimientos del fabricante. La purificación del ADN se basa en la tecnología de glóbulo magnético para el aislamiento de ADN genómico a partir del tejido vegetal. Las concentraciones de ADN se cuantifican con un espectrofotómetro NanoDrop.

- 20 La determinación de genotipo de la población F2 (tomando como base Hazera no. 1 y Hazera no. 2) se realiza utilizando un arreglo de chip Axiom Affymetrix hecho a la medida que contiene aproximadamente 9500 SNP para jitomates (tecnología de determinación de genotipo multiplex).

- 25 Se seleccionan y descubren marcadores de SNP para jitomates a partir de diferentes fuentes que incluyen dominio público, proyectos y colaboraciones de LVS. Todos los SNP se validan en pre-tamizaje (experiencia previa en otras tecnologías) y se seleccionan de conformidad con lo siguiente:

- frecuencia polimórfica/de alelo
- representación de variación en todo el mundo
- remoción de agrupaciones de SNP
- SNP colocados de manera uniforme de conformidad con la distancia del mapa físico
- 30 • representación más baja en regiones de heterocromatina (pericentromérica)

- 35 La determinación de genotipo de LD alto con el arreglo de chip Axiom de Affymetrix se realiza utilizando el protocolo estándar recomendado por el fabricante. El procedimiento incluye los siguientes pasos: amplificación, fragmentación, precipitación, re-suspensión y preparación para hibridación del ADN, hibridación al chip, lavado, ligación, tinción y barrido. Se efectúan dos últimos pasos mediante el instrumento GeneTitan de Affymetrix. El análisis se efectúa mediante un algoritmo de agrupación automático desarrollado por Affymetrix.

- 40 Se utiliza una asociación de modelo lineal mixto de manera independiente para los síntomas tanto del fruto como foliares.

- Los resultados del mapeo revelan un QTL candidato asociado con la tolerancia y/o resistencia foliar al virus del fruto rugoso café del jitomate localizado en el cromosoma 11 y dos QTL candidatos asociados con tolerancia y/o resistencia del fruto al virus del fruto rugoso café del jitomate localizado en los cromosomas 6 y cromosoma 9.

- 45 Los marcadores vinculados significativamente con los diversos QTL para tolerancia/resistencia foliar y/o del fruto al virus del fruto rugoso café del jitomate y sus posiciones en el genoma del jitomate se resumen en la tabla 4. La secuencia de los SNP, incluyendo las secuencias de flaqueo se reportan en la tabla 5 y en la parte del listado de secuencias que acompaña a la solicitud.

- 50 Los resultados muestran que un QTL (QTL1 de la presente invención) responsable de la tolerancia y/o resistencia del fruto al virus del fruto rugoso café del jitomate está localizado en el cromosoma 6, entre la posición 33 932 438 y la posición 33 933 905, y que el segundo QTL (QTL2 de la presente invención) responsable de la tolerancia y/o resistencia del fruto al virus del fruto rugoso café del jitomate está localizado en el cromosoma 9, entre la posición 4 800 680 y la posición 59 014 540, dichas posiciones físicas en el genoma están basadas en la versión 2.40 del genoma del jitomate (Bombarely 2011). La región del cromosoma 9 es una región de tasa de recombinación baja.

- 60 La región del cromosoma 6 es una región propensa a introgresión y ya se han mapeado varios genes de interés en esta región, entre otras cosas, la introgresión de genes implicados en la tolerancia a la sal provenientes de *S. lycopersicoides*, *S. pennellii* y *S. pimpinellifolium* (Li *et al*, Euphytica (2011) 178: 403), la introgresión de genes implicados en la resistencia al oidio provenientes de *S. habrochaites* y *S. neorickii* (Seifi *et al*, Eur J Plant Pathol (2014) 138: 641) y la introgresión de genes implicados en el virus del mosaico del pepino (WO2013/064641).

- 65 Los resultados muestran que el QTL responsable de la tolerancia y/o resistencia foliar al virus del fruto rugoso café del jitomate está localizado en el cromosoma 11, entre la posición 9 548 029 y la posición 10 015 478, dicha posición física en el genoma está basada en la versión 2.40 del genoma del jitomate (Bombarely 2011).

Se efectúa un análisis adicional con marcadores adicionales con el fin de caracterizar de mejor manera el QTL en el cromosoma 11 responsable de la resistencia foliar. Los resultados se presentan en la tabla 6 y las secuencias de los SNP se reportan en las tablas 5 y 7.

- 5 Estos resultados adicionales permiten definir, con base en el valor p y los valores R^2 , y en base a la variación de dichos valores a lo largo del cromosoma 11, que el QTL responsable de la tolerancia foliar al virus del fruto rugoso café del jitomate se encuentra ampliamente localizado en el cromosoma 11, entre los SNP TO-0122252 y TO-0162427, es decir entre la posición 8 090 264 y la posición 10 018 811, dichas posiciones físicas en el genoma están basadas en la versión 2.40 del genoma del jitomate. Los SNP TO-0122252 y TO-0162427 que flanquean la
- 10 definición más amplia del locus QTL son mencionados con un asterisco (*) en la tabla 6. Una definición más estrecha de la ubicación del QTL en el cromosoma 11 es la región definida por los SNP TO-0142270 y TO-0162432. Estos marcadores de flanqueo de la definición más estrecha del locus están mencionados con (**) en la tabla 6. Los SNP que tienen la asociación más significativa con el QTL que confiere resistencia/tolerancia foliar están mencionados con "+" en la tabla 6, específicamente TO-0181040, TO-0123057 y TO60125528.

15 **TABLA 4 Lista de los SNP, su posición y los alelos encontrados en plantas susceptibles (1^{er} nucleótido mencionado: alelo S) contra los alelos de los marcadores vinculados con la tolerancia/resistencia (2^o nucleótido mencionado: alelo T)**

20

SNP	R ²	Valor P	Cromosoma	Posición SL2.40	Alelo S/T
TO-0005197	0,33402601	5,61E-08	6	33932438	C/T
TO-0145581	0,33402601	5,61E-08	6	33933905	T/C
TO-0180955	0,33863743	1,68E-11	9	4800680	A/G
TO-0196724	0,351965936	4,96E-12	9	5203457	T/C
TO-0145125	0,347544015	6,03E-12	9	40025769	A/G
TO-0196109	0,33402601	2,09E-11	9	59014540	T/G
TO-0182276			11	9548029	A/G
TO-0181040	0,848753	2,35E-50	11	9797143	A/G
TO-0123057	0,8477487	5,33945E-51	11	9825111	T/G
TO-0125528	0,8477487	5,33945E-51	11	9837711	G/A
TO-0162432	0,7216998	8,88E-34	11	10015478	T/C

TABLA 5 Secuencia de los SNP

25

	SEQ ID	Secuencia de los SNP; el alelo asociado con la tolerancia o resistencia al virus del fruto rugoso café del jitomate es el segundo mencionado entre corchetes
TO-0005197	1	GTCGGACCAAGAAACCATATTTGGTAACGGGTTTCGAGTTGCTGCCTGAAC CTTTTAGCCC[C/T]TTGCAATATTTGTGAAGTGATATTCCTTTGTGTTATTAA TAATTTTTCGTTTTGAGTTTT
TO-0145581	2	TTCAGAGAGCAACACTCCTGCAAGACCAACTCGGAGTAATTCAGTAACT CGACCTTCCAT[T/C]TCTAGCTCTCAGTATAGTACTTACTCAAATAAATCA GGCTCTATTCTAAACACAAGCTCT

(continuación)

	SEQ ID	Secuencia de los SNP; el alelo asociado con la tolerancia o resistencia al virus del fruto rugoso café del jitomate es el segundo mencionado entre corchetes
TO-0180955	3	TTCCGAAATGAGGACGATCCATCAGCTTCTTCAGCTGAGAGCCCCCTGG TC[A/G]ACATACCAGAATTCTGTTTTCTAAAACTGTCCAAAATCTCCTGT AAAGA
TO-0196724	4	GATTTGAATGCCTTGCCACAGCCAGAGGATGACGA[T/C]GAGATTTTT GGACAACAATTAGAAGATGAACCACA
TO-0145125	5	AGAGAATGATATCACTGCCTTAGTTTCTCAATTAAGTTGTGCAAAA ACAAAACACACA[A/G]CTAGATGAAGAAAACAGAGCATTGCCTCAA AGCTTCAGACAAAAGAAGTTGAGAACAAC
TO-0196109	6	TACAATACCTTCTGGCATCCCTTTCCGCAAAACGA[T/G]AGATCTTTAG TATCAAAACCGAGAGCACTGTCACC
TO-0182276	13	CTCCTATTGAACATCCTGAAAATTGTGTCTACATCATGAGAAGATGCA GGCCAATTC[A/G]CTCAGTACATGGAATGCACGAGCATGTTAGGGGA ATTCTAACGCAAAGCATAAGCTTGATACTTGAATAAAGATGAAACAT ACTTACTTCTTCTCAAACT
TO-0181040	14	CTCTTGGTGACAAACCACTGGCTCAATTTCTTCGCGAAGCTAAAG CTATC[A/G]CTGATGAGCTTGTACGGCAGGCACACGTGTCTCCTGATG AATCAATGC
TO-0123057	15	CATTACTGTTGAGATATCTCATCGGCAACCCCTGGAGCTTGCCAC CCGC[T/G]TGCCTCCAGGATCTGATTTAGAAAGGATGAATAGTAAGTGT GTTTCAG
TO-0125528	16	CAAGAACCCAACGACTTCTTCTTTGCTTATTGAAAACTTGGT TTTGAAATGAAAGG[G/A]ATCGAGAAATTGGATACTCAGTGGTTCTCTAC TACTAAACCTTCTCCTGATTTTAAGAAA
TO-0162432	17	TGATCGACAATTCTTGTGTTGTTGTTGAACTCTGCAAGTGAGAGAGGGATG [T/C]ATATAG AGAAAGGATATTGGTAAAGGACAACTCTAGAAGGGTCTA GGGAA

TABLA 6 Marcadores de flanqueo adicionales – análisis de la asociación que mapea la resistencia del follaje tomando como base la población F2 de HAZ1. Se reportan los alelos encontrados en plantas susceptibles (alelo S) y los alelos de los marcadores vinculados con la tolerancia/resistencia (2^{do} nucleótido mencionado: alelo T)

SNP	R ²	Valor P	Posición en el cromosoma 11 SL2,40	Marcadores de flanqueo	Alelo S/T
TO-0122252	0,7758002	1,16E-40	8090264	*	A/T
TO-0144325	0,8101493	9,62E-45	8140310		
TO-0144322	0,8001583	1,10E-42	8163278		
TO-0144317	0,8051598	2,07E-44	8334467		
TO-0101684	0,8051598	2,07E-44	8345699		
TO-0197358	0,8051598	2,07E-44	8357644		
TO-0144313	0,8051598	2,07E-44	8410749		
TO-0144309	0,8249175	1,65E-46	8412924		
TO-0144308	0,8051598	2,07E-44	8414574		
TO-0144303	0,8051598	2,07E-44	8419932		
TO-0121816	0,797688	2,30E-42	8626324		
TO-0142268	0,7613548	5,39E-39	8631287		
TO-0142270	0,8064465	1,37E-44	8633469	**	C/T
TO-0142294	0,8474345	6,06E-51	8764030		
TO-0142299	0,8474345	6,06E-51	8891489		
TO-0142301	0,8474345	6,06E-51	8900707		
TO-0142302	0,8474345	6,06E-51	8902922		
TO-0142303	0,8474345	6,06E-51	8903092		
TO-0142305	0,8474345	6,06E-51	8962512		
TO-0142306	0,8474345	6,06E-51	9318832		
TO-0142307	0,8474345	6,06E-51	9318930		
TO-0162436	0,7855676	7,54E-41	9789608		
TO-0181040	0,848753	2,35E-50	9797143	+	A/G
TO-0123057	0,8477487	5,34E-51	9825111	+	T/G
TO-0125528	0,8477487	5,34E-51	9837711	+	G/A
TO-0162432	0,7216998	8,88E-34	10015478	**	T/C
TO-0162427	0,7459438	2,53E-37	10018811	*	C/T

TABLA 7 Secuencias de los SNP adicionales

	SEQ ID	Secuencia de los SNP; el alelo asociado con la tolerancia o resistencia a TBRFV es el segundo mencionado entre corchetes
TO-0122252	7	ATGGCAATAGTGAAGTGCAGATACAACTGAAATTGCAGAACAC CCTTAAA[A/T]ATAGAATCAATAGAAAGTTGCAACAATATTTGAA TGATGAAGCAACAAAG
TO-0142270	9	AACACCAGGTAGAGAGCACAGCGAAACAATGGCCTCAGGAAG ATCTACTT[C/T]GCGAAGTGCAGCAAGCCACTCCATACCTCCAC CAGGCTTTGATTTCAAGT
TO-0162427	18	GCACCAGTTATAGTAATGTCCTGCTTCTTTCTGTACCCTTATC AGTAGC[C/T]GTGACAGAAAGAATACCGTTGGTGTCAATGTCGA ACTTCACTTCAATCTG

EJEMPLO 5**5 Validación adicional del marcador**

Un marcador muy asociado con la tolerancia foliar al virus TBRF está definido en el borde de la región del QTL3 como el marcador candidato cercano al gen de resistencia. Este SNP se diseña para la tecnología KASPar monoplex para SNP: la prueba KASPar utilizada para la validación se efectúa tomando como base el método KASP de KBioscience (LGC Group, Teddington, Middlesex, Reino Unido).

Los iniciadores para las pruebas de SNP KASP se diseñan utilizando el *software* de selector de iniciador de LGC. Debido a un SNP, se diseñan dos iniciadores sentido específicos de alelo y un iniciador antisentido común por cada prueba de SNP. Las pruebas de determinación de genotipo KASP están basadas en PCR específica de alelo competitivo y permiten la calificación bi-alélica de los SNP en loci específicos. En resumen, Se agregan la mezcla para prueba KASP específica de SNP y la mezcla maestra para KASP universal a muestras de ADN, después se efectúa una reacción ciclado térmico, seguida por una lectura de fluorescencia de punto final. La discriminación bi-alélica se logra a través de la unión competitiva de dos iniciadores sentido específicos de alelo, cada uno con una secuencia de cola única que corresponde a dos cassettes para FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) universal, uno de los cuales se marca con el colorante FAM™ y el otro de los cuales se marca con el colorante VIC™ (LGC, www.lgcgroup.com).

Se pipetea un volumen de 3 µl de ADN en placas para PCR de cubierta dura, de 384 cavidades, negras y se secan a temperatura ambiente. Cuando se realiza la determinación de genotipo, el ADN se suspende agregando unos 3 µl de mezcla para PCR, de conformidad con el protocolo del fabricante (KBioscience). Los resultados de la PCR para determinación de genotipo se analizan utilizando el *software* KlusterCaller (KBioscience). El marcador utilizado en este estudio es TO-0182276 (SEQ ID NO: 13).

Se utiliza la población F2 de HAZ3 x HAZ4 (tabla 2) para esta validación de marcador. Las plantas F2 se genotipan utilizando este marcador y también se fenotipan respecto a síntomas foliares como se describe en el ejemplo 3. La asociación está 100% basada en datos de 251 plantas.

Los datos de resumen de la determinación de fenotipo de síntomas foliares y de la determinación de genotipo del marcador candidato se presentan en la tabla 8: marcador R significa homocigoto para el alelo de resistencia/tolerancia, marcador S significa homocigoto para el alelo susceptible, marcador H significa heterocigoto que comprende los dos alelos:

TABLA 8

	Número de plantas	Número de plantas con síntomas de tolerancia o resistencia a TBRFV foliar	Número de plantas con síntomas de susceptibilidad a TBRFV foliar
Marcador R	67	67	0
Marcador S	62	0	62
Marcador H	122	0	122

EJEMPLO 6**Análisis de la asociación para el mapeo de gen**

Se utilizan las plantas de jitomate Hazera no. 3 y Hazera no. 4 para construir la población de mapeo bi-parental F2. La planta de jitomate Hazera no. 3 que muestra un fenotipo de resistencia foliar al virus del fruto rugoso café del jitomate se cruza con la planta susceptible Hazera no. 4 con el fin de crear una F1 la cual se utiliza después para generar una población segregante F2.

Las cruza, determinación de fenotipo y asociaciones se efectúan como se describe en el ejemplo 4, con HAZ1 y

HAZ2.

El QTL para resistencia foliar y los marcadores asociados más significativos se identifican en el cromosoma 11, como se detalla en la tabla 9 y se ilustra en la figura 3.

Tal como en el ejemplo 4, la definición más amplia del locus que comprende el QTL está definida por marcadores de flaqueo con asterisco en la tabla 9, específicamente los SNP TO-012252 y TO0162427. Estos SNP son los mismos que los que flanquean la definición más amplia de la posición del QTL según se deduce a partir de los resultados obtenidos con la otra fuente de tolerancia, específicamente HAZ1. Este punto corrobora fuertemente la conclusión en cuanto a que el QTL para la tolerancia foliar es el mismo para HAZ1 y HAZ3.

HAZ1 corresponde a las semillas HAZTBRFVRES1 depositadas en el NICMB bajo el número de accesoión 42758.

Una definición más estrecha del locus del QTL, según se deduce a partir de los resultados en la población HAZ3 está definida por los marcadores de flaqueo TO-0144317 y TO-0125528 en el cromosoma 11 (marcadores ** en la tabla 9). Los marcadores con la asociación más significativa a la tolerancia/resistencia foliar al TBRFV son los marcadores mencionados con (+), específicamente TO-0142303, TO-0142306 y TO60142294.

TABLA 9 Lista de SNP adicionales, su posición y los alelos encontrados en plantas susceptibles (1^{er} nucleótido mencionado: alelo S) contra los alelos de los marcadores vinculados con la tolerancia/resistencia (2^o nucleótido mencionado: alelo T)

SNP	R ²	Valor P	Posición en el cromosoma 11 SL2.40	Marcadores de flaqueo	Alelo S/T
TO-0122252	0,81927235	1,55E-60	8090264	*	A/T
TO-0144317	0,854230073	6,90E-69	8334467	**	T/C
TO-0142303	0,884698061	3,46E-77	8903092	+	C/A
TO-0142305	0,884698061	3,46E-77	8963512		
TO-0142306	0,884698061	3,46E-77	9318832	+	G/A
TO-0142307	0,884698061	3,46E-77	9318930		
TO-0142294	0,884698061	3,46E-77	8764030	+	A/G
TO-0142299	0,884698061	3,46E-77	8891489		
TO-0142301	0,884698061	3,46E-77	9800707		
TO-0142302	0,884698061	3,46E-77	8902922		
TO-0144308	0,854199247	7,02E-69	8414574		
TO-0144303	0,854199247	7,02E-69	8419932		
TO-0142268	0,854144413	7,24E-69	9631287		
TO-0142270	0,854144413	7,24E-69	8633469		
TO-0121816	0,854144413	7,24E-69	8626324		
TO-0144313	0,853890923	2,18E-68	8410749		
TO-0181040	0,851931696	2,47E-68	9797143		
TO-0123057	0,851931696	2,47E-68	9825111		
TO-0125528	0,851931696	2,47E-68	9837711	**	G/A
TO-0144309	0,853578274	6,78E-68	8412924		
TO-0162436	0,851618235	7,62E-68	9789608		
TO-0197358	0,848638959	9,80E-67	8357644		
TO-0101684	0,831991299	7,32E-64	8345699		
TO-0144325	0,821665121	9,46E-62	8140310		
TO-1444322	0,822371998	1,62E-61	8163278		
TO-0162427	0,789778057	6,28E-56	10018811		C/T

TABLA 10 Secuencia de los SNP adicionales

	SEQ ID	Secuencia de los SNP; el alelo asociado con la tolerancia o resistencia a TBRFV es el segundo mencionado entre corchetes
TO-0144317	8	AGCCATTGTGATTGTGTCTGTTGTACATTACCAAAATTCTCTAGA GAAAG[T/C]GATACACATGCCAGCCCTATCGATATAAAGCAACGC AAGGTGGATTCTGC
TO-0142303	11	GAGGAGCTATCAACTTCATAGTCAGATTCAGAAAATGATTCAGAT GAGGA[C/A]GTGGCTGATTCTTCTTTCTTTCTTCTCTCTGC TCGAACTCTCTCC
TO-0142306	12	CAGAAATAATAGAAAATCAGAAAGAAAAATCAGCTTTCTAAATGG AAAAG[G/A]CGATGGCACTATGTTTGAAGTTTAAAGCAACTTTCT GAAGTCCCAAAAG

(continuación)

	SEQ ID	Secuencia de los SNP; el alelo asociado con la tolerancia o resistencia a TBRFV es el segundo mencionado entre corchetes
TO-0142294	10	TCAACTGCAACTTTAACAGCTGATTCAACTTCTTCTTCTTCGAA ACATC[A/G]CATTGAATGTAACGACCTCCAATAGATTGAGCTAAA CTTGTACCTACTTC

Tomados en conjunto, estos resultados confirman la presencia de un QTL que confiere tolerancia foliar, ampliamente localizado dentro de la región cromosómica delimitada por TO-012252 y TO0162427 y de manera más precisa por TO-0144317 y TO-0125528.

En vista de los resultados del ejemplo 4, estos resultados demuestran por tanto que la ubicación de este QTL se puede definir de manera conveniente como entre TO-0142270 y TO-0125528.

10 EJEMPLO 7

Modificación genética de semillas de jitomate mediante sulfonato de etil-metano (EMS)

Las semillas de variedades de jitomate se tratan con EMS mediante inmersión de aproximadamente 2000 semillas por variedad en una solución aireada de cualquiera de 0.5% (p/v) o 0.7% de EMS durante 24 horas a temperatura ambiente.

Aproximadamente 1500 semillas tratadas por variedad por dosis de EMS se germinan y las plantas resultantes se cultivan, de preferencia en un invernadero, por ejemplo, de mayo a septiembre, para producir semillas. Después de la maduración, se cosechan semillas M2 y se almacenan a granel en un combinado por variedad por tratamiento. Los combinados resultantes de semillas M2 se utilizan como material de partida para identificar las semillas M2 individuales y las plantas con una tolerancia del fruto y/o foliar al virus del fruto rugoso café del jitomate.

REIVINDICACIONES

1. Una planta de *Solanum lycopersicum* que comprende de manera homocigota en su genoma un locus de rasgo cuantitativo recesivo, designado "QTL3", en el cromosoma 11, dentro de la región cromosómica delimitada por TO-0122252 (SEQ ID NO:7) y TO-0162427 (SEQ ID NO:18), que confiere a la planta tolerancia foliar al virus del fruto rugoso café del jitomate (TBRFV), y en donde el dicho QTL3 está presente en el genoma de una planta de las semillas HAZTBRFVRES1 número de accesión NCIMB 42758.
2. Una planta de *Solanum lycopersicum* que comprende de manera homocigota en su genoma un locus de rasgo cuantitativo recesivo (QTL), designado "QTL2", en el cromosoma 9, dentro de la región cromosómica delimitada por TO-0180955 (SEQ ID NO:3) y TO-0196109 (SEQ ID NO:6), que confiere a la planta tolerancia del fruto al virus del fruto rugoso café del jitomate, en donde el dicho QTL2 está presente en el genoma de una planta de las semillas HAZTBRFVRES1 número de accesión NCIMB 42758.
3. La planta de *S. lycopersicum* de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizada por** la presencia en el genoma de dicha planta de *S. lycopersicum* de por lo menos uno de los siguientes alelos:
 - alelo G de TO-0180955 (SEQ ID NO:3) y/o
 - alelo C de TO-0196724 (SEQ ID NO:4) y/o
 - alelo G de TO-0145125 (SEQ ID NO:5) y/o
 - alelo G de TO-0196109 (SEQ ID NO:6) para la presencia de QTL2.
4. La planta de *S. lycopersicum* de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por** la presencia en el genoma de dicha planta de *S. lycopersicum* de por lo menos uno de los siguientes alelos:
 - alelo T de TO-0122252 (SEQ ID NO:7) y/o
 - alelo C de TO-0144317 (SEQ ID NO:8) y/o
 - alelo T de TO-0142270 (SEQ ID NO:9) y/o
 - alelo G de TO-0142294 (SEQ ID NO:10) y/o
 - alelo A de TO-0142303 (SEQ ID NO:11) y/o
 - alelo A de TO-0142306 (SEQ ID NO:12) y/o
 - alelo G de TO-0182276 (SEQ ID NO:13) y/o
 - alelo G de TO-0181040 (SEQ ID NO:14) y/o
 - alelo G de TO-0123057 (SEQ ID NO:15) y/o
 - alelo A de TO-0125528 (SEQ ID NO:16) y/o
 - alelo C de TO-0162432 (SEQ ID NO:17) y/o
 - alelo T de TO-0162427 (SEQ ID NO:18) para la presencia de QTL3.
5. La planta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha planta es una progenie de semillas de HAZTBRFVRES1 (número de accesión NCIMB 42758) por auto-fecundación o como descendencia de primera generación.
6. Una célula de una planta de *S. lycopersicum* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende en su genoma dicho QTL2 en el cromosoma 9 y/o dicho QTL3 en el cromosoma 11, que confieren el fenotipo mejorado que corresponde a tolerancia del fruto o foliar al TBRFV.
7. Parte vegetal de una planta de *S. lycopersicum* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en particular semillas, explantes, material reproductivo, púa, corte, semilla, fruto, raíz, patrón, polen, óvulo, embrión, protoplasto, hoja, antera, tallo, pecíolo o flores, en donde dicha parte vegetal comprende células de acuerdo con la reivindicación 6.
8. Un método para detectar y/o seleccionar plantas de *S. lycopersicum* que tienen un QTL en el cromosoma 11 tal como se encuentra en el genoma de las semillas HAZTBRFVRES1 (número de accesión NCIMB 42758), dichos QTLs que confieren un fenotipo mejorado solamente cuando presentes de manera homocigota, correspondiendo a tolerancia foliar al virus del fruto rugoso café del jitomate, comprendiendo dicho método detectar por lo menos uno de los siguientes marcadores alelo T de TO-0122252, alelo C de TO-0144317, alelo T de TO-0142270, alelo G de TO-0142294, alelo A de TO-0142303, alelo A de TO-0142306, alelo G de TO-0182276, alelo G de TO-0181040, alelo G de TO-0123057, alelo A de TO-0125528, alelo C de TO-0162432 y alelo T de TO-0162427 en una muestra de material genético de la planta que se va a seleccionar.
9. Un método para mejorar el rendimiento de plantas de jitomate en un ambiente infestado por el TBRFV o para reducir la pérdida en la producción de jitomate en condición de infestación por el TBRFV o para proteger un campo, túnel o invernadero de plantas de jitomate de la infestación por el TBRFV comprendiendo el paso inicial de identificar plantas de jitomate tolerantes al TBRFV, comprendiendo en su genoma un QTL3 recesivo en el cromosoma 11, dentro de la región cromosómica delimitada por TO-0122252 (SEQ ID NO:7) y TO-0162427 (SEQ ID NO:18), que confiere a dichas plantas tolerancia foliar al TBRFV, mediante la detección de por lo menos uno de los siguientes marcadores: alelo T de TO-0122252, alelo C de TO-0144317, alelo T de TO-0142270, alelo G de TO-0142294, alelo A de TO-0142303, alelo A de TO-0142306, alelo G de TO-0182276, alelo G de TO-0181040, alelo G de TO-

0123057, alelo A de TO-0125528, alelo C de TO-0162432 y alelo T de TO-0162427 en una muestra de material genético de las plantas y cultivando dichas plantas de jitomate comprendiendo de manera homocigota en su genoma dicho QTL3 recesivo en el cromosoma 11, en donde dicho QTL está presente en el genoma de una planta de las semillas HAZTBFRVRES1 número de accesoión NCIMB 42758.

- 5
10. Uso de una planta de jitomate tolerante al TBRFV para controlar la infestación por el TBRFV de un campo, túnel o invernadero, en donde dicha planta de jitomate comprende de manera homocigota en su genoma un QTL2 recesivo en el cromosoma 9, dentro de la región cromosómica delimitada por TO-0180955 (SEQ ID NO:3) y TO-0196109 (SEQ ID NO:6), y/o un QTL3 recesivo en el cromosoma 11, dentro de la región cromosómica delimitada por
- 10 TO-0122252 (SEQ ID NO:7) y TO-0162427 (SEQ ID NO:18), que confieren a dicha planta tolerancia al TBRFV, en donde dichos QTLs están presentes en el genoma de una planta de las semillas HAZTBFRVRES1 número de accesoión NCIMB 42758.

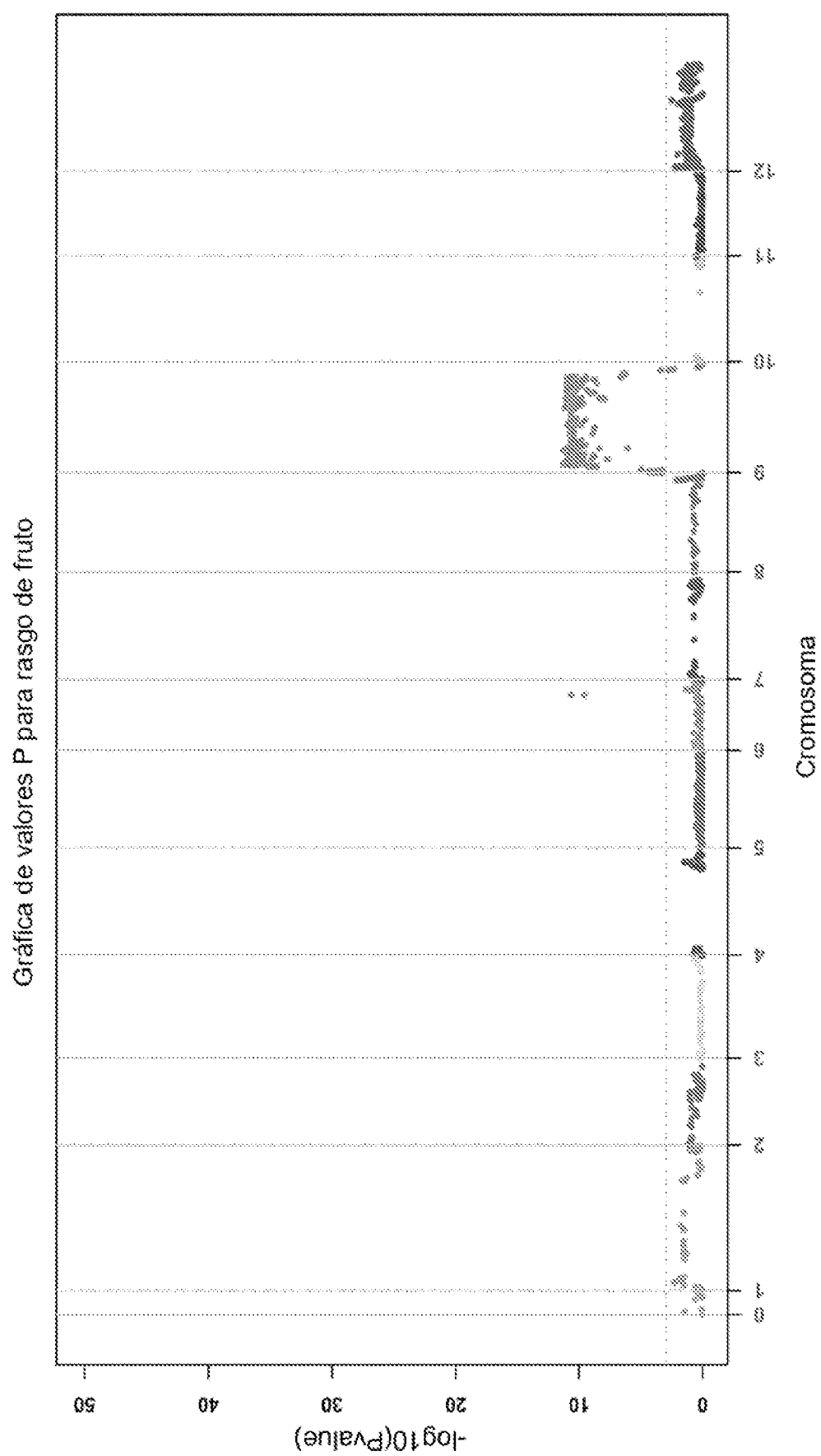
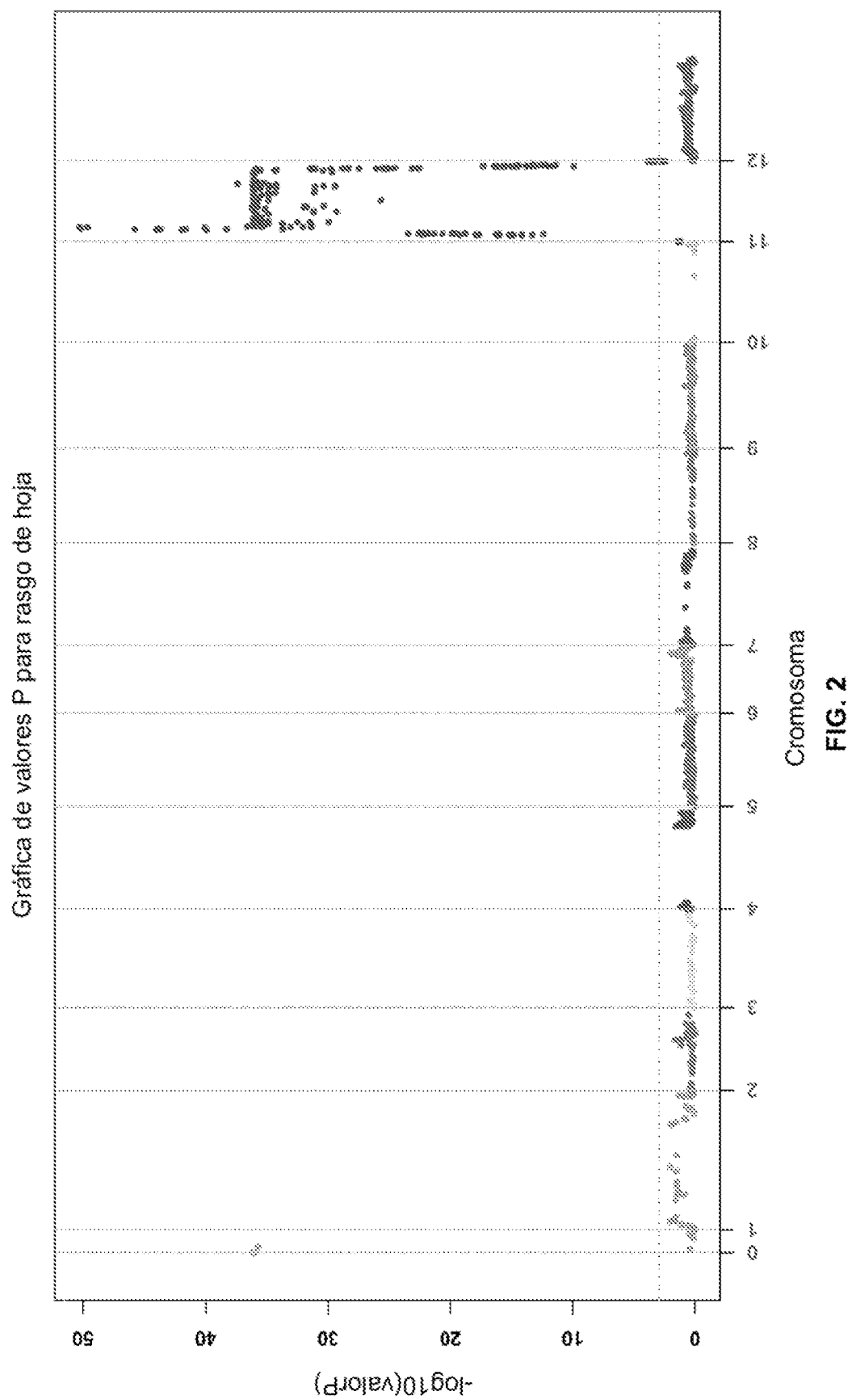


FIG. 1



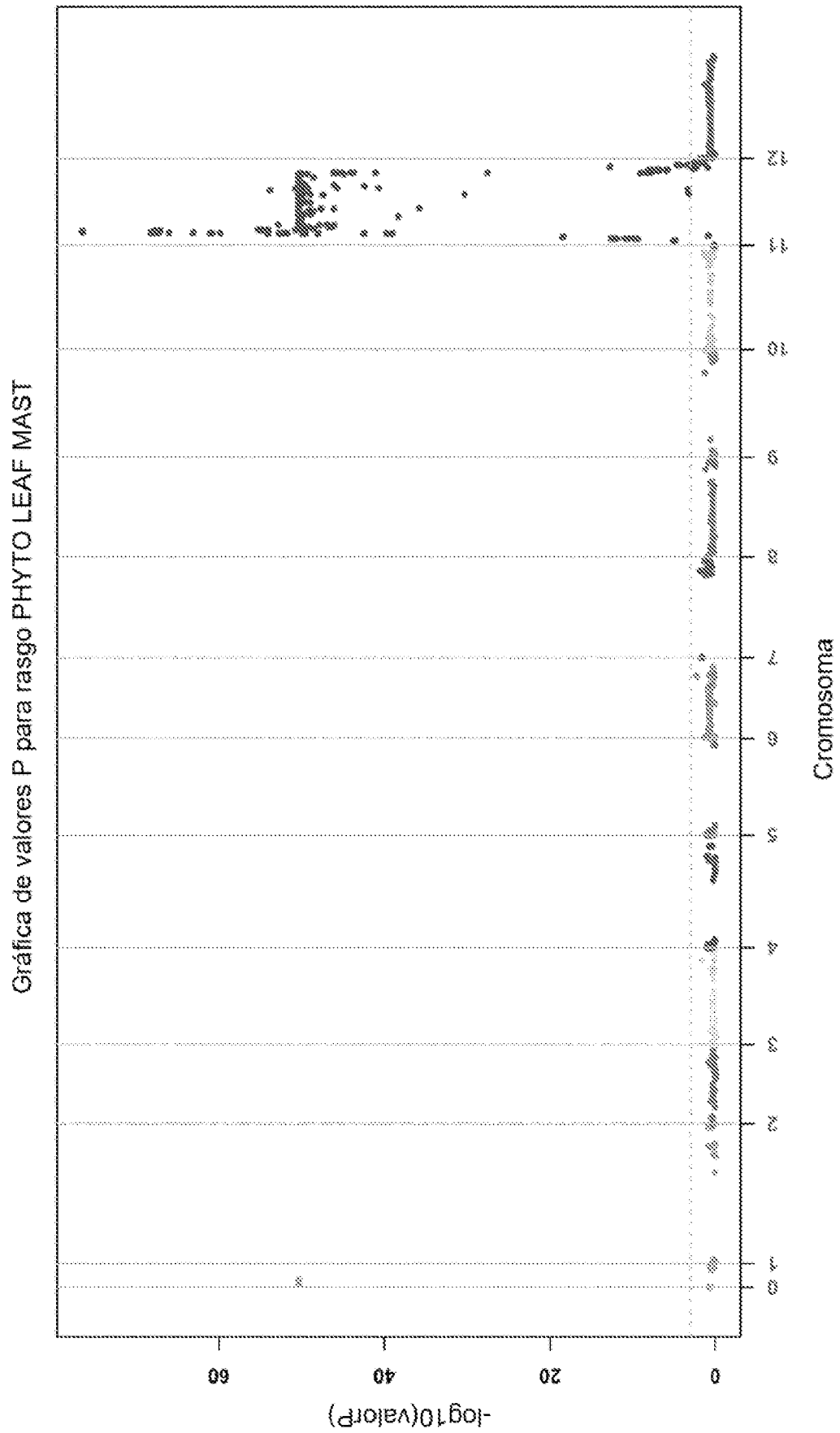


FIG. 3