



Mejoramiento de caracteres de calidad de fruta en tomate y mandarina utilizando edición génica

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, PEDECIBA

ANA ARRUABARRENA

TUTORA: SABINA VIDAL, COTUTORA: JOANNA LADO
Laboratorio de Biotecnología, Estación Experimental INIA Salto Grande, INIA, Salto

NOVIEMBRE DE 2024



Contenido

Lista de abreviaciones.....	3
Agradecimientos	5
Resumen	6
1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1 Carotenoides.....	8
1.2 Mejoramiento genético con énfasis en calidad de fruta y carotenoides	16
2. OBJETIVO GENERAL e HIPÓTESIS	23
2.1 Objetivo general.....	23
2.2 Hipótesis de trabajo	23
2.4 Estructura de la tesis.....	23
3. CAPÍTULO 1: Obtención de líneas elite de tomate con hábito de crecimiento indeterminado, acumulación temprana de licopeno y tolerantes al daño por frío poscosecha.....	25
3.1 Introducción.....	25
3.2 Objetivos específicos	26
3.3 Metodología.....	27
3.4 Resultados.....	31
3.5 Discusión y conclusiones.....	39
4. CAPÍTULO 2: Caracterización de alelos y genes que codifican la enzima Fitoeno Sintasa (PSY) en tomate (cultivado y silvestre).	44
4.1 Introducción.....	44
4.2 Objetivos específicos	45
4.3 Metodología.....	45
4.4 Resultados.....	48
4.5 Discusión y conclusiones.....	54
5. CAPÍTULO 3: Caracterización de la biosíntesis de carotenoides en híbridos nacionales de mandarinas y generación de alelos defectuosos de la enzima β LCY2 específica del fruto.	57
5.1 Introducción.....	57
5.2 Objetivos específicos.	59
5.3 Metodología.....	59
5.4 Resultados.....	66
5.5 Discusión y conclusiones.....	81
6. DISCUSION GENERAL	85
7. PERSPECTIVAS	87
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

9. ANEXO: ARTÍCULO PUBLICADO Y CAPÍTULO DE LIBRO ACEPTADO PARA PUBLICACIÓN	108
--	-----

Lista de abreviaciones

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
ANOVA	Analysis of variance (análisis de la varianza)
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
β CHX	Beta caroteno hidroxilasa
β LCY	Beta licopeno ciclasa
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphism sequence
Cas	CRISPR associated protein (Proteína asociada a CRISPR)
CC	Cambio de color
CCD	Dioxigenasas de corte de carotenoides
cM	Centimorgans
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Espaciadas)
crRNA	ARN crispr
CrtISO	Carotenoide isomerasa
cv.	Cultivar
CYC-B	Licopeno β ciclasa específica de cromoplastos de tomate
DPF	Daño por frío
DPC	Días poscosecha
ϵ LCY	Épsilon licopeno ciclasa
EE	Error estándar
<i>forward</i>	De avance
GGPP	Geranylgeranyl difostato
HPLC	High pressure liquid chromatography
HRFA	High Resolution Fragment Analysis (Análisis de fragmento de alta resolución)
HRM	High Resolution Melting (desnaturalización de alta resolución)
IC	Índice de color
INIA	Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
<i>Knockout</i>	perdida de función

LB	Medio Luria-Bertani
M	Maduro
MEP	2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato
MS	Medio de cultivo Murashige-Skoog
MT	Medio de cultivo Murashige-Tucker
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OD ₆₀₀	Densidad óptica medida a una longitud de onda de 600nm
<i>og</i>	<i>old gold</i>
<i>og^c</i>	<i>old gold crimsom</i>
OGM	Organismo genéticamente modificado
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDS	Fitoeno desaturasa
PF	Peso fresco
PS	Peso seco
PSY	Fitoeno sintasa
ROS	Reactive oxygen species (Especies reactivas del oxígeno)
SNP	single nucleotide polymorphism (polimorfismo de un nucleótido)
<i>Sp</i> o <i>sp</i>	<i>Self-pruning</i>
SR	Pomelo Star Ruby
T-DNA	<i>Transfer DNA</i> (ADN de transferencia)
UTR	<i>Untranslated region</i> (región no traducida)
VI	Verde inmaduro
VM	Verde maduro
wt	<i>wild type</i> (salvaje)
ZISO	ζ-caroteno isomerasa

Agradecimientos

Primero, quiero agradecer Sabina y Joanna, por aceptarme como su estudiante y aportar cada una desde su experiencia y sus conocimientos al trabajo que logramos llevar adelante, y sobre todo por la paciencia y la dedicación que me brindaron en estos años. Ha sido realmente un placer aprender de ustedes y, sobre todo, discutir, planificar, presentar posters y escribir artículos y proyectos juntas. Espero que continuemos en ese camino. Gracias a Matías, a Tato y a Marco por apoyar este tema de tesis y a INIA, ANII, CISC y PEDECIBA por su financiamiento. Agradezco también a Lázaro Peres, Claudia Stange y a sus equipos de trabajo por recibirme en sus laboratorios y enseñarme herramientas fundamentales para desarrollar este trabajo. Gracias al CAS, por las productivas instancias de discusión de avances de resultados.

Agradezco profundamente a mis compañeros de laboratorio Mario, Ana Lucía y Candela, que han sido fundamentales para poder llevar adelante este trabajo. También a los equipos de INIA SG de Citricultura, de Horticultura, especialmente a Nacho, y sobre todo a los integrantes del equipo de Calidad y Poscosecha que me han enseñado muchísimo y han colaborado hombro con hombro en muchas oportunidades para sacar adelante este trabajo. También agradezco a Facundo y Florencia, de INIA LB, por la colaboración en las medidas por HPLC. Luciana, gracias por ayudarme con los ensayos de actividad *in vitro* y los intentos de *Southern*s y gracias a todo el grupo de BMV, que me escucharon hablar incontables veces de esta tesis y sus resultados. Valentina, gracias por engancharte para seguir estudiando los tomates editados. Victoria, gracias por el apoyo, consejos y empujoncitos para terminar.

Quiero agradecer a la comunidad de investigador@s y docentes que llevan adelante el desarrollo de la Biotecnología y la Biología Molecular en Plantas en el Uruguay, espero que sigamos creciendo y colaborando. A mis compañeros de INIA que se animan a navegar las aguas de la biotecnología y me hacen estudiar cosas nuevas todo el tiempo y también a los compañeros de Bio que están en otras estaciones, pero siempre “a mano”.

Gracias Diego, por acompañarme por acá y por allá, por que hablemos el mismo “idioma”, por parar en los caminos a mirar plantitas y juntar semillas, porque junto a Julia y Andrés forman la parte más importante de mi vida, mi FAMILIA, que son el motor para seguir, siempre avanzando. A los tres, gracias por aguantarme hablar y hablar del licopeno, el licopeno y el licopeno.

Agradezco también al resto de mi familia (incluidos los Michelinis), por estar siempre para dar una mano con Julia y Andrés cuando hay que ir a un congreso, a un curso o terminar de escribir, sobre todo a la Tía Elena. También a Silvina, que siempre está dispuesta a dar una mano más con estos niños cuando lo necesitamos.

Por último y, sobre todo, quiero agradecer a mis padres, Sonia y Arturo, por el apoyo incondicional que recibí de ellos a lo largo de mi vida y por los valores que me inculcaron, que me hacen la persona que hoy soy.

Gracias, de alguna forma todos ustedes contribuyeron a que mi camino llegue hasta esta parada, para seguir transitándolo de la mejor manera posible.

Resumen

Muchos programas de mejoramiento genético de frutas y hortalizas han incluido entre sus objetivos la obtención de variedades con frutos de mayor calidad organoléptica, valor nutricional y conservación poscosecha. El tomate y las mandarinas son frutos que se consumen habitualmente en la dieta occidental. Los primeros son la principal fuente de licopeno y las segundas constituyen una importante fuente de vitamina C y carotenoides. El hecho de tratarse de frutos altamente consumidos en la dieta humana los hace buenos candidatos para mejorar su estética, composición nutricional y su conservación poscosecha, favoreciendo su elección y previniendo pérdidas y desperdicios de alimentos. Una estrategia posible para contribuir al logro de estos objetivos consiste en promover la acumulación de compuestos bioactivos que, además de aportar beneficios a la salud humana, aporten color y contribuyan a la conservación poscosecha. El color del fruto de tomates y de cítricos, está directamente relacionado con el perfil y el contenido de carotenoides. Cuanto mayor es el contenido de licopeno en un fruto de tomate, más intenso será su color rojo. También adquieren un color rojo los mutantes de cítricos en los que se acumula licopeno. Tanto en tomate como en citrus, se han realizado esfuerzos en mejoramiento genético para obtener cultivares con mayor contenido de licopeno. Además, se han empleado estrategias de transgénesis y, recientemente, de edición génica, para abordar este objetivo en plantas.

En este trabajo se buscó mejorar la calidad del fruto en tomate y mandarinas mediante la manipulación del contenido de carotenoides, específicamente licopeno. Además, se estudiaron los mecanismos de acumulación de carotenoides en tomate y mandarinas explorando la función de nuevos genes en tomate y caracterizando germoplasma local en mandarinas. A su vez, se logró implementar la edición génica en dos especies vegetales de hábitos diferentes, una especie autógama no leñosa como el tomate y una especie alógama leñosa como las mandarinas. En tomate se editaron dos genotipos elite del programa de mejoramiento genético de INIA, logrando materiales de hábito de crecimiento indeterminado y de color rojo intenso, con una acumulación más temprana y homogénea de licopeno durante la maduración. A su vez, estos tomates resultaron más tolerantes al daño por frío durante la conservación postcosecha. El estudio de las PSYs en tomate cultivado y silvestre reveló diferencias importantes en la expresión de *PSY1* y se diseñaron marcadores moleculares para su potencial introgresión en el tomate cultivado. En el caso de mandarinas, se caracterizó la acumulación de carotenoides durante la maduración del fruto de genotipos nacionales y se estudió la transcripción y actividad de los alelos presentes de β *LCY2* en estos 4 híbridos y en variedades de referencia. Lo anterior reveló diferencias importantes entre especies y variedades y una efectiva funcionalidad del gen *β LCY2b* para catabolizar el licopeno, sin existencia de sesgos transcripcionales entre ambos alelos en la mandarina M9. Se logró la edición génica del genotipo B30, contando actualmente con plantas regeneradas en fase de aclimatación con los alelos de β *LCY2* editados. Los genotipos generados en el marco de este proyecto constituyen las primeras plantas editadas reportadas en nuestro país y, además, en el caso de mandarinas, las primeras a nivel mundial.

1. INTRODUCCIÓN

El consumo de frutas y hortalizas es esencial para la dieta y la salud humana debido a que estos alimentos son las principales fuentes de antioxidantes, fibras y vitaminas (Passam et al., 2011). En Uruguay, el consumo diario estimado de frutas y hortalizas es de 289 gramos per cápita, muy por debajo de los 400 g/día recomendados por la Organización Mundial de la Salud (Zoppolo and Colnago, 2021). Estos valores son similares a los observados a nivel mundial en general (Passam et al., 2011).

Muchos programas de mejoramiento genético han incluido entre sus objetivos la obtención de variedades con frutos de mayor calidad organoléptica, valor nutricional y conservación poscosecha, sin perder los atributos favorables para la producción (rendimiento, adaptación al sistema productivo, resistencia a enfermedades y tolerancia a estrés abiótico) (Deng et al., 2011). La calidad de frutas y hortalizas se puede definir como una combinación dinámica entre las propiedades de estos productos y la percepción de los consumidores. Por lo tanto, la calidad está relacionada con propiedades intrínsecas del fruto, influenciadas por el genotipo, el ambiente y la poscosecha, y con propiedades extrínsecas, que están determinadas por factores socioeconómicos y de mercado que influyen en la percepción y preferencias de los consumidores (Kyriacou and Rouphael, 2018). Existen diferentes formas de evaluar la calidad de las frutas. Una de ellas se centra en la evaluación sensorial, ya sea a través de paneles de jueces, evaluadores semi entrenados o consumidores y otra se basa en cuantificar analíticamente las variables fisicoquímicas. Esta última está determinada por la combinación de diferentes parámetros cuyo óptimo varía, a su vez, de acuerdo con la especie. Estas variables pueden ser: color, calibre, forma, firmeza, sólidos solubles, acidez y contenido de diferentes compuestos bioactivos (carotenoides, antocianinas, compuestos fenólicos, vitaminas, entre otros)(Passam et al., 2011; Ulrich and Olbricht, 2011). Estas características o la combinación de ellas son un insumo fundamental para los mejoradores al momento de seleccionar genotipos de alta calidad de fruta y a la hora de caracterizar una nueva variedad o parentales elite de los programas de mejoramiento genético.

En la actualidad, los consumidores están acostumbrados a contar con una amplia oferta de diferentes frutas y hortalizas, además, son conscientes de las propiedades nutricionales y nutraceuticas de los frutos que potencian la salud. En consecuencia, los consumidores se han transformado en actores fundamentales en la demanda de frutas y hortalizas de alta calidad, influyendo en las prioridades de los programas de mejoramiento (Diamanti et al., 2011; Natalini et al., 2021).

El tomate y las mandarinas son frutos que se consumen habitualmente en la dieta occidental. Los primeros son la principal fuente de licopeno y las segundas constituyen una importante fuente de vitamina C y carotenoides (Singh and Goyal, 2008; Al-Juhaimi, 2014). El hecho de tratarse de frutos altamente consumidos en la dieta humana los hace buenos candidatos para mejorar su estética, sus valores nutricionales y su conservación poscosecha, promoviendo así un mayor consumo de frutas y hortalizas y previniendo las pérdidas y desperdicios de alimentos.

Una estrategia posible para contribuir al logro de estos objetivos consiste en promover la acumulación de compuestos bioactivos, como pigmentos carotenoides específicos, que, además de aportar beneficios a la salud humana, aporten color y tengan el potencial de mejorar la conservación poscosecha.

1.1 Carotenoides

Los carotenoides son un grupo de compuestos isoprenoides sintetizados por todos los organismos fotosintéticos (plantas, algas y cianobacterias) y algunos organismos no fotosintéticos (arqueas, bacterias, hongos y animales -algunos insectos y ácaros-) (Rodríguez-Concepcion et al., 2018). Si bien son un grupo extremadamente diverso, con más de 1000 compuestos aislados provenientes de fuentes naturales, se los puede considerar como un grupo debido a algunas propiedades químicas y físicas que comparten (Rodríguez-Concepcion et al., 2018; Britton, 2022; Gómez-Sagasti et al., 2023). Poseen un esqueleto de 40 carbonos (C_{40}) del que derivan todas las variantes individuales que se conocen, además poseen una cadena central de polienos que es común a todos los carotenoides (Britton, 2022). Esta cadena, contiene un número variable de dobles enlaces conjugados, lo cual determina que los carotenoides absorban luz visible en diferentes rangos, resultando en los diferentes colores característicos de estos pigmentos que oscilan desde el amarillo al rojo e incluyen algunos carotenoides incoloros (Rodríguez-Concepcion et al., 2018).

Los carotenoides se pueden clasificar en lineales o cíclicos conforme su estructura. Los cíclicos presentan anillos en uno o ambos extremos, mientras que los lineales carecen de ellos. De acuerdo con su composición química, se pueden clasificar en carotenos, formados únicamente por carbono e hidrógeno, o xantofilas donde se observa presencia de oxígeno en los grupos funcionales (Rodríguez-Concepcion et al., 2018; Britton, 2022). Además, la cadena de dobles enlaces hace que existan numerosos isómeros geométricos que resultan de las configuraciones *cis* o *trans* de los dobles enlaces. Normalmente, los carotenoides naturales se encuentran en sus configuraciones “all-*trans*”.

La mayoría de los carotenoides son lipofílicos y su esterificación con lípidos potencia esta propiedad. Sin embargo, algunos carotenoides pueden asociarse con restos de azúcares o con proteínas, lo que hace que aumente su solubilidad en agua. La cadena de dobles enlaces conjugados determina las propiedades fisicoquímicas de estos compuestos, siendo la responsable directa de su color, conformación en el espacio, reactividad y propiedades fotoquímicas (Rodríguez-Concepcion et al., 2018).

1.1.1 Funciones biológicas de los carotenoides

Las propiedades fisicoquímicas de los carotenoides y su gran variabilidad determinan en gran medida sus funciones biológicas (Wurtzel, 2019). Sólo los organismos carotenogénicos son capaces de sintetizar carotenoides, mientras que los demás deben adquirirlos en la dieta.

1.1.1a Funciones biológicas en organismos carotenogénicos.

Los organismos carotenogénicos son aquellos capaces de sintetizar carotenoides e incluyen las algas y plantas, así como algunos hongos, bacterias y animales. En plantas, los carotenoides tienen funciones primarias (esenciales) y secundarias (no esenciales). Estos pigmentos son indispensables para la foto protección frente al daño oxidativo que se genera durante la fotosíntesis. Mitigan el daño ocasionado por luz intensa ya que dispersan el exceso de energía en forma de calor, eliminan radicales libres y protegen a las membranas de la peroxidación lipídica (Rosas-Saavedra and Stange, 2016; Rodríguez-Concepcion et al., 2018); forman parte del fotosistema 2 y se encuentran en las membranas tilacoidales asegurando su fluidez en situaciones de estrés abiótico y son, también, precursores de fitohormonas como el Ácido Abscísico (ABA), las Estrigolactonas (SL) y moléculas relacionadas con la señalización y regulación como la Zaxinona (Rodríguez-Concepcion et al., 2018; Gómez-Sagasti et al., 2023).

Las funciones secundarias de los carotenoides en plantas están relacionadas con la comunicación entre plantas y animales; en flores funcionan como atrayentes para polinizadores y en frutos como atrayentes de animales para la dispersión de semillas principalmente como pigmentos y también relacionados a la producción de compuestos volátiles involucrados en el aroma (Rosas-Saavedra and Stange, 2016; Rodríguez-Concepcion et al., 2018). En otros organismos fotosintetizadores como bacterias y algas, también participan en la fotosíntesis y en la protección frente a estrés oxidativo y, además, en algunas microalgas, se acumulan en células específicas en condiciones de estrés (Rodríguez-Concepcion et al., 2018; Sutherland et al., 2022).

En hongos carotenogénicos, el rol de los carotenoides se considera secundario ya que los mutantes albinos no presentan dificultades para desarrollarse. Sin embargo, podrían estar involucrados en la protección frente a estrés oxidativo y la producción de hormonas sexuales en algunas especies. En las bacterias y arqueas carotenogénicas (no fotosintetizadoras) se los ha relacionado con funciones antioxidantes, protección a especies reactivas del oxígeno y ataque de los neutrófilos (en bacterias patógenas de humanos) y en ciertas bacterias tolerantes al radio se han relacionado con la protección frente a agentes que dañan el ADN (Rodríguez-Concepcion et al., 2018; Sutherland et al., 2022). En animales que son capaces de producir carotenoides (varios grupos de artrópodos), donde los genes se han adquirido mediante transferencia horizontal a partir de hongos en diversas ocasiones a lo largo de la evolución, se considera que tienen un rol ecológico, donde el polimorfismo de colores hace que estos animales tengan diferente susceptibilidad a enemigos naturales (Misawa et al., 2021; Takemura et al., 2021).

1.1.1b Funciones biológicas en organismos no carotenogénicos.

Los organismos no carotenogénicos, incapaces de sintetizar carotenoides *de novo*, deben obtenerlos de su alimento o vía simbiosis con organismos carotenogénicos. Algunos mamíferos absorben carotenos y los acumulan en el tejido adiposo. También en algunos casos, los carotenoides se encuentran en la leche, como en el caso de rumiantes (β -caroteno) y de humanos (carotenos y luteína). Aves y anfibios son capaces de absorber xantofilas. En el caso de aves, se acumulan luteína y zeaxantina en la yema de los huevos de gallina y en otras aves, como los flamencos, se acumulan en las plumas, donde juegan un rol social. Algunos peces como el salmón y la trucha acumulan carotenoides en sus músculos; mientras que algunos moluscos (almejas y mejillones) y crustáceos (camarón y langosta) los acumulan en su exoesqueleto (Alcaíno et al., 2016; Rodríguez-Concepcion et al., 2018).

En algunos de estos organismos, la acumulación de carotenoides tiene un rol en la pigmentación del organismo como en el caso de aves, peces y crustáceos. En los mamíferos, incluidos los humanos, los carotenoides tienen diversas funciones, muchas de ellas han sido estudiadas exhaustivamente y otras aún se están dilucidando. En los humanos, la principal función de los carotenoides es la actividad provitamina A (Maoka, 2020). El α - y β -caroteno y la β -criptoxantina son los carotenoides dietarios que poseen este tipo de actividad, ya que su procesamiento enzimático durante el proceso de absorción en las células del epitelio en el intestino delgado libera retinal, para su posterior reducción a retinol. Además, una proporción de estos compuestos sin procesar y los otros carotenoides dietarios (licopeno, luteína y zeaxantina) son absorbidos y transportados al sistema circulatorio para ser posteriormente acumulados en diferentes órganos y tejidos (Terao, 2023). Los principales carotenoides dietarios cumplen un rol importante como antioxidantes, participando en la prevención de varias enfermedades (revisado recientemente por J. Terao, 2023). Pueden funcionar como antioxidantes directos eliminando las moléculas de oxígeno singulete y frenando la reacción en cadena de la peroxidación lipídica que ocurre en biomembranas como resultado del estrés oxidativo. En paralelo, las moléculas derivadas del catabolismo de carotenoides pueden funcionar como inductoras

de la vía de señalización mediada por la proteína Nrf2 que, a su vez, induce la respuesta de defensa antioxidante a través de la expresión de enzimas que ayudan a regular el balance redox de las células (Terao, 2023).

En cuanto a la contribución de los carotenoides dietarios principales en su rol como antioxidantes en la prevención de enfermedades, se han realizado varios estudios y ensayos clínicos, algunos de ellos con resultados positivos y otros no concluyentes o con resultados opuestos a lo esperado. En el caso de la degeneración de la mácula relacionada con la edad (AMD, por su sigla en inglés), la luteína y zeaxantina provenientes de la dieta se asocian con la prevención de esta enfermedad y el enlentecimiento de su progreso en pacientes con AMD, incluso con algunas mejoras en la visión (Snodderly, 1995; Terao, 2023). La acumulación de carotenoides, especialmente β -caroteno y licopeno, en la piel también está asociada con una disminución en la susceptibilidad a eritemas provocados por quemaduras solares, así como con la prevención del foto-envejecimiento (Zerres and Stahl, 2020; Terao, 2023). También se ha asociado la acumulación de licopeno en testículos con la mejora en la fertilidad en pacientes con infertilidad idiopática (Gupta and Kumar, 2002). En cuanto al rol del licopeno en la prevención del cáncer de próstata, algunos estudios indican resultados positivos mientras que otros no son concluyentes, por lo que es necesario continuar generando evidencia para afirmar o refutar esta hipótesis (Dulińska-Litewka et al., 2021; Terao, 2023). La ingesta de los seis carotenoides dietarios se ha asociado, también con un menor riesgo de padecer infartos y otras enfermedades cardiovasculares a través de múltiples mecanismos, complementarios a la acción antioxidante directa (Bahonar et al., 2017; Terao, 2023). Se postula que la ingesta de carotenoides contribuye al retraso del inicio y la progresión de la retinopatía causada por diabetes. En enfermedades hepáticas, como el hígado graso no alcohólico y la cirrosis, los carotenoides muestran un efecto protector, como antioxidantes, provitamina A y reguladores del metabolismo lipídico de hepatocitos (Elvira-Torales et al., 2019). Además, la ingesta de carotenoides está inversamente asociada con síntomas de depresión lo que podría significar que estos pigmentos podrían ayudar a disminuir el riesgo de desarrollar esta enfermedad (Yu et al., 2022). Finalmente, se ha asociado la ingesta de carotenoides, especialmente licopeno, β -caroteno y β -criptoxantina, con una mejor salud ósea y una disminución del riesgo de padecer osteoporosis (Kulczyński et al., 2024). Tomando en cuenta estas evidencias, podemos concluir que la ingesta de alimentos ricos en carotenoides tiene un impacto positivo elevado en la salud humana en diversos aspectos.

1.1.2 Acumulación de carotenoides en frutos y sus mecanismos de regulación

1.1.2a Biosíntesis y catabolismo de carotenoides

La acumulación de carotenoides en plantas es un proceso dinámico que depende de la tasa de síntesis y degradación de éstos, así como de su almacenamiento estable en plastidios (Sun et al., 2020a).

La biosíntesis de carotenoides ocurre exclusivamente en plastidios, utilizando como precursor dos moléculas de geranylgeranyl difosfato (GGPP) provenientes de la ruta del MEP (2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato). Las dos moléculas de GGPP son condensadas por la acción de la Fitoeno Sintasa (PSY) para generar el fitoeno (15-*cis*-fitoeno), primer carotenoide con un esqueleto de 40 carbonos. Este primer paso se considera como uno de los más importantes y limitantes de la ruta de síntesis. A continuación, el fitoeno sufre una serie de reacciones de desaturaciones e isomerizaciones hasta transformarse en licopeno (all-*trans*-licopeno). Estos pasos son catalizados secuencialmente por las enzimas fitoeno desaturasa (PDS), ζ -caroteno isomerasa (Z-ISO), ζ -caroteno desaturasa (ZDS) y carotenoide isomerasa (CrtISO) (Figura 1) (Lado et al., 2016; Sun et al., 2020b). A partir de la ciclación del licopeno, la ruta se

divide en dos ramas, la β,β y la β,ϵ . En la rama β,β actúa la enzima licopeno β ciclasa (β LCY) para generar dos anillos β en el licopeno y formar así β -caroteno. En la rama β,ϵ , la enzima β LCY en coordinación con la enzima licopeno ϵ ciclasa (ϵ LCY) forman un anillo β y otro ϵ en el licopeno para formar α -caroteno (Rodríguez-Concepción et al., 2018; Sun et al., 2020b). A partir de la hidroxilación del α o β -caroteno y subsiguientes epoxidaciones comienza la formación de Xantofilas (carotenoides con anillos oxigenados). Las hidroxilaciones son catalizadas por dos tipos de Hidroxilasas, el primer tipo incluye dos hidroxilasas del anillo β (que no contienen grupo hemo), β CHX1 y β CHX2 que actúan principalmente en la rama β,β y el segundo tipo contiene dos hidroxilasas hemo del tipo del citocromo P450 (CYP97C y CYP97A) que actúan en la rama β,ϵ . Luego de varios pasos de hidroxilación de los anillos ϵ y β del α -caroteno, la rama β,ϵ culmina con la formación de luteína. La hidroxilación de los dos anillos β del β -caroteno produce primero la β -criptoxantina y luego la zeaxantina. A continuación, la zeaxantina es epoxidada por la enzima Zeaxantina epoxidasa (ZEP) para producir primero anteraxantina y luego violaxantina. A su vez, la violaxantina puede ser de-epoxidada por la acción de la luz o de la Violaxantina de-epoxidasa (VDE) y volver a convertirse en zeaxantina. Finalmente, la conversión de la violaxantina en neoxantina por la enzima neoxantina sintasa (NSY) es el último paso de la ruta de síntesis de carotenoides (Sun et al., 2020b).

En catabolismo de carotenoides ocurre tanto en organismos carotenogénicos como en organismos que los obtienen de la dieta y puede suceder por dos mecanismos. El primero consiste en la rotura inespecífica por oxidación fotoquímica o por oxidación enzimática inespecífica realizada por lipoxigenasas o peroxidasas que generan una serie de apocarotenoides no específicos que, en algunos casos como el β -ciclocitral, actúan como señales indicadoras de estrés. El segundo mecanismo es el clivaje enzimático oxidativo específico por parte de las dioxigenasas de corte de carotenoides (en inglés: Carotenoid Cleavage Dioxygenases “CCDs”). En organismos no carotenogénicos, estas enzimas (BCO1 y BCO2) cortan los carotenoides dietarios para generar vitamina A y otros apocarotenoides involucrados en vías de señalización que van desde el estrés hasta procesos de desarrollo embrionario (Moise et al., 2022). En plantas, existen dos grupos de CCDs, el primero contiene las NCEDs (9-cis-epoxycarotenoid dioxygenases); enzimas encargadas de sintetizar el precursor de la fitohormona ABA denominado xantonina; el segundo grupo incluye a varias enzimas CCD diferentes que tienen distintas especificidades de sustratos. Las CCD7 y 8 están involucradas en la síntesis de estrigolactonas a partir del β -caroteno; las CCD 1 y 4 reconocen varios carotenoides como sustrato y producen diversos apocarotenoides como, por ejemplo, bixina, azafrán, α y β -ionona, β -ciclocitral, β -citaurina y crocetina. CCD1 y 4 se han relacionado con la producción de apocarotenoides volátiles vinculados al aroma; CCD 2 y 4 con la pigmentación de algunos frutos y flores y LCD (lycopene cleavage dioxygenase) con la producción de bixina (Beltran and Stange, 2016; Moreno et al., 2021).

1.1.2b Acumulación de carotenoides en frutos: mecanismos de regulación.

El contenido y perfil de carotenoides de los diversos frutos que se consumen habitualmente en la dieta depende de la actividad de las enzimas de biosíntesis y catabolismo, así como de la disponibilidad de precursores y plastidios capaces de almacenarlos, del estadio de maduración del fruto y también de los factores ambientales y las condiciones poscosecha a los que están expuestos (Lado et al., 2016b). Cuando los frutos son inmaduros y realizan fotosíntesis son de color verde y presentan un perfil de carotenoides característico de tejidos fotosintéticos. A medida que el fruto madura, se degrada la clorofila y se desorganizan las estructuras internas de los cloroplastos, que se transforman en cromoplastos (plastidios especializados en acumular carotenoides). Los cromoplastos que se encuentran en frutos suelen derivar de cloroplastos, pero también, en menor medida, pueden generarse a partir de proplastidos o amiloplastidos (Sun et al., 2018). Durante la biogénesis de los

cromoplastos, aumenta la síntesis de carotenoides, que se refleja en un incremento en la expresión de genes que codifican para enzimas de la ruta de síntesis de carotenoides y de las rutas precursoras como la ruta MEP. En muchos casos, estos genes tienen una expresión exclusiva en frutos en momentos específicos del desarrollo y/o maduración (Liu et al., 2015b). Además de la regulación a nivel de la transcripción, muchas de las enzimas de la ruta de síntesis de carotenoides están reguladas a nivel post-transcripcional y post-traducciona.

La regulación de la biosíntesis y catabolismo de carotenoides es específica para cada tipo de fruto y se relaciona directamente con el perfil y contenido de carotenoides de esa especie o variedad particular. En la Figura 1 podemos apreciar diferentes frutos que acumulan distintos carotenoides. En algunos casos, se ha descrito el mecanismo de regulación que lleva a estos resultados, pero en otros casos aún se desconocen los mecanismos que operan en la acumulación de un tipo de carotenoide en particular (Lado et al., 2016b).

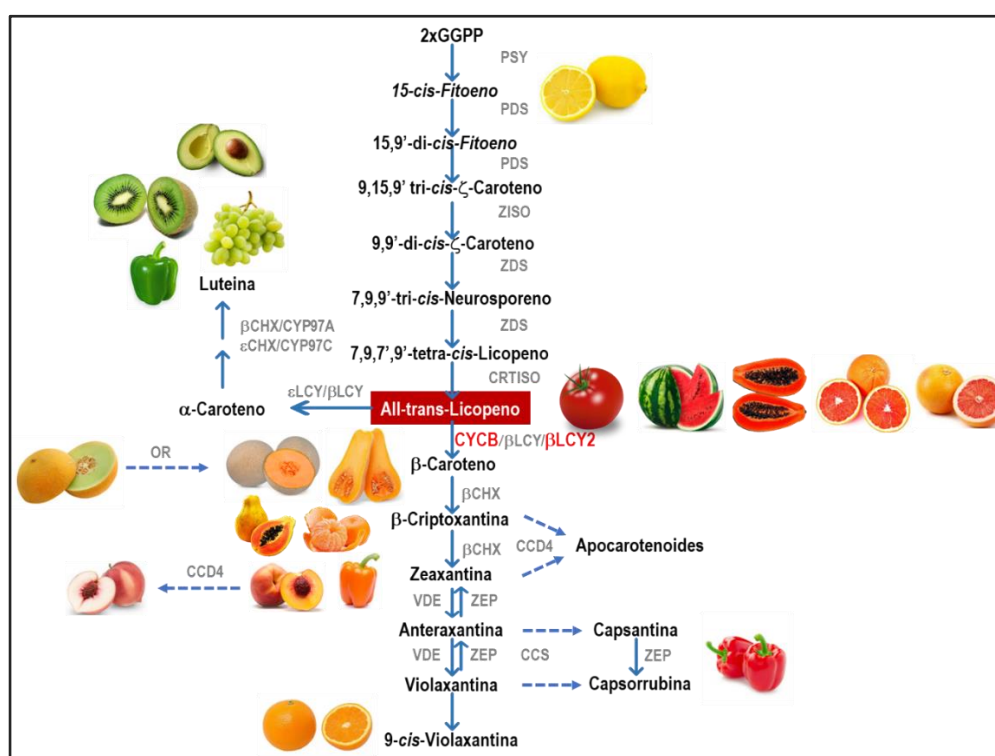


Figura 1. Esquema de la biosíntesis de carotenoides en plantas. Con letras grises están señaladas las siglas correspondientes a las enzimas conocidas responsables de cada paso. Al lado de cada carotenoide se encuentran imágenes de frutos representativos que acumulan ese compuesto mayoritariamente. PSY: fitoeno sintasa, PDS: fitoeno desaturasa, ZISO: ζ-caroteno isomerasa, ZDS: ζ-caroteno desaturasa, CRTISO: licopeno isomerasa, β y εLCY: β- y ε-licopeno ciclasa (CYC-B y βLCY2 son específicas de cromoplastos de tomate y citrus, respectivamente), β y εCHX: no hemo β- y ε-caroteno hidroxilasa, CYP97A y CYP97C: hemo citocromo P450hidroxilasa, ZEP: zeaxantina epoxidasa, VDE: violaxantina de-epoxidasa, CCD4: dioxigenasa de corte de carotenoides tipo 4, CCS: capsantina capsorrubina sintasa, OR: proteína ORANGE. Figura adaptada de Lado et al., 2016.

La Fitoeno Sintasa (PSY) es la principal enzima clave en la biosíntesis de carotenoides y está altamente regulada a distintos niveles por diferentes mecanismos. En primera instancia, hay una regulación a nivel transcripcional, tanto frente a estímulos externos como en respuesta a señales endógenas. Los estímulos externos incluyen luz, temperatura, estrés hídrico y salinidad, mientras que los estímulos internos son señales del desarrollo y circadianas, fitohormonas, y señales de retroalimentación

negativa o positiva (Zhou et al., 2022). A su vez, en varias especies de plantas existen 2 o 3 genes parálogos que codifican para diferentes isoformas de la PSY, que responden a diferentes estímulos y se expresan en distintos tejidos. En tomate y maíz, por ejemplo, existen 3 genes que codifican para fitoeno sintasas. *PSY1* se expresa en tejidos no fotosintéticos como flores, frutos y granos, es responsable de la acumulación de carotenoides en cromoplastos de estos órganos y responde a estímulos como luz, temperatura y señales del desarrollo; *PSY2* se expresa en tejidos fotosintéticos y *PSY3* se expresa en raíces, donde regula los niveles de ABA en respuesta a estrés y la síntesis de estrigolactonas en respuesta a la micorrización (Sathasivam et al., 2021; Zhou et al., 2022). Numerosos factores de transcripción se han reportado como reguladores positivos (RIN, *FUL1*, *BBX20*, *MADS6*) o negativos (*SGR1*, *RAP2.2* y *NAC1*) de la expresión génica de *PSY* en varias especies vegetales, también factores de transcripción que responden a señales fotomorfogénicas como *HY5* o *PIF1* que activan o reprimen la expresión de *PSY*, respectivamente (Stanley and Yuan, 2019; Sathasivam et al., 2021; Zhou et al., 2022). Los niveles de expresión de *PSY* también son regulados epigenéticamente mediante la modificación de histonas (deshacetilasa *HDA3* en tomate) y mediante la metilación y desmetilación del ADN durante la maduración de frutos (Arango et al., 2016; Zhou et al., 2022). El segundo nivel de regulación de *PSY* es a nivel de la traducción o post-transcripcional. Se ha reportado que existe *splicing* alternativo en la región 5' UTR que genera transcritos con diferente longitud y distintas eficiencias de la traducción en *Arabidopsis thaliana*, frutos de tomate, trigo y azafrán (Ahrazem et al., 2019; Álvarez et al., 2016; Chen et al., 2019; Howitt et al., 2009). El tercer nivel de regulación de *PSY* se da a nivel post-traducciona, e incluye la interacción con diferentes proteínas que favorecen la degradación o estabilización de la enzima, modificando su vida media y su abundancia. Una de las proteínas involucradas en este nivel de regulación, es *PPSR1*, que en tomate interactúa con el péptido precursor de *PSY1* y promueve su degradación, a través de su ubiquitinación (Wang et al., 2020). A su vez, *PSY1* interactúa físicamente con las proteínas chaperona Orange y la Clp proteasa. A través de la interacción con estas dos proteínas se logra un balance entre la estabilización y la degradación de *PSY1* que permite una regulación fina de su abundancia y actividad y, por ende, de la biosíntesis de carotenoides (Welsch et al., 2018). Finalmente, se ha demostrado que la proteína *FBN6* de *A. thaliana* interactúa físicamente con *PSY* incrementando la actividad de la última y favoreciendo la síntesis de carotenoides en cromoplastos y también en cloroplastos (Iglesias-Sanchez et al., 2023).

Los ejemplos mencionados demuestran la importancia de la enzima *PSY* y su rol como principal enzima reguladora de la biosíntesis de carotenoides. Sin embargo, la regulación del metabolismo de carotenoides involucra a muchas otras enzimas, y varía de acuerdo con el tejido y la especie vegetal. Muchos de los factores de transcripción que regulan la expresión de *PSY* también regulan la expresión de genes de otras de las enzimas de la ruta de síntesis como *PDS*, *ZISO*, *ZDS*, *CrtISO*, *LCYβ* y ϵ , β *CHX*, ya sea induciendo o reprimiendo su expresión. En *A. thaliana*, se han reportado mecanismos de modificaciones epigenéticas a través de metiltransferasas de histonas (Set Domain Group 8, *SDG8*) que controlan la expresión de *CrtISO* y mecanismos de *splicing* alternativo para *ZISO*. En tomate, a nivel postraducciona, se reportó la acción de la proteasa *ClpR1* que incrementa los niveles de transcripción de *LCYβ*, *CYC-B* y *CYP97C11* (Stanley and Yuan, 2019; Sathasivam et al., 2021).

Además de estos pasos de regulación del metabolismo de carotenoides, cabe señalar que existen otros niveles de regulación que operan para lograr la acumulación de carotenoides específicos en frutos, y que estos mecanismos varían entre especies y resultan de la combinación de intrincadas redes de regulación (Lado et al., 2016b). Estas redes responden a estímulos variados, como señales del desarrollo y ambientales (temperatura, luz, nutrición, entre otras), así como también se ven influenciadas por la disponibilidad de estructuras capaces de almacenar carotenoides, como los cromoplastos. Estos organelos tienen un rol de sumidero en el metabolismo de la planta y su

biogénesis desencadena la producción de estos pigmentos, o viceversa, dado que aún no ha sido dilucidado plenamente este mecanismo (Llorente et al., 2016; Llorente et al., 2017; Rodríguez-Concepción et al., 2018; Sun et al., 2018).

1.1.2c Acumulación de carotenoides en el fruto del tomate

El tomate y sus productos derivados se consideran la principal fuente de licopeno en la dieta debido a su alto consumo (Arballo et al., 2021). Durante el proceso de maduración del fruto de tomate, aumentan los niveles de expresión génica de enzimas clave en la ruta de síntesis de carotenoides y de sus precursores a la vez que se reprime la expresión génica de las enzimas encargadas de transformar el licopeno en α y β caroteno (Liu et al., 2015b; Duduit et al., 2022). En consecuencia, comienza a acumularse licopeno, desarrollándose color rojo a medida que progresa la maduración. En la madurez, aproximadamente el 90% de los carotenoides corresponden a licopeno, seguido de un 7% de β -caroteno, un 2% de luteína y el restante 1% de fitoeno y fitoflueno (Ronen et al., 2000). Si bien el licopeno es el carotenoide predominante en los tomates rojos, existe variabilidad en la cantidad de licopeno que pueden acumular diferentes genotipos e incluso dentro del mismo genotipo, dependiendo de las condiciones ambientales del cultivo durante el desarrollo y maduración del fruto, así como durante la conservación poscosecha (Astija et al., 2023; Cebolla-Cornejo et al., 2013; Ilahy et al., 2018; Roselló et al., 2011; Verheul et al., 2015). Adicionalmente, existen genotipos portadores de diferentes mutaciones que alteran el contenido y el perfil de carotenoides en el fruto del tomate, y consecuentemente, su color. Muchas de estas mutaciones afectan directamente la función o la expresión de enzimas clave de la biosíntesis de carotenoides y, en otros casos, las mutaciones afectan a proteínas relacionadas con la regulación de la ruta (Van Tuinen et al., 1997; Pal et al., 2019; Chattopadhyay et al., 2021). Entre los genotipos con mutaciones en enzimas clave de la ruta encontramos los mutantes *yellow flesh*, *tangerine*, *Beta*, *old gold*, *old gold crimson*, *A949G*, *Delta* y *high pigment 3* (Ronen et al., 1999; Ronen et al., 2000; Isaacson et al., 2002; Cebolla-Cornejo et al., 2013; Silletti et al., 2013; Liu et al., 2015b; Chattopadhyay et al., 2021). Dichos mutantes exhiben diferentes fenotipos asociados al tipo de carotenoide que acumulan. De esa manera, existen genotipos donde los frutos no acumulan carotenoides (*yellow flesh*) al tener una isoforma inactiva de PSY1, genotipos de fruto anaranjado (*Beta*), que acumulan β -caroteno debido a que no disminuye la expresión de la Licopeno β ciclasa (CYC-B) a medida que progresa la maduración del fruto, y genotipos que acumulan mayor cantidad de licopeno al presentar isoformas inactivas de la misma enzima, por lo que su fruto es de color rojo más intenso (*old gold*, *old gold crimson* y *A949G*) (Ronen et al., 2000; Silletti et al., 2013; Liu et al., 2015b; Chattopadhyay et al., 2021). Otros mutantes relacionados con la carotenogénesis presentan mutaciones en genes involucrados en la regulación de la ruta por hormonas (*rin*, *nor*, *alc*, etc.) o luz (*high pigment 1* y *2* e *Intense pigment*) (Cebolla-Cornejo et al., 2013; Liu et al., 2015b). Muchos de estos mutantes se han utilizado para obtener cultivares comerciales, sin embargo, en algunos casos, tienen efectos pleiotrópicos no deseados que limitan su uso para el mejoramiento genético (Stommel, 2006; Cebolla-Cornejo et al., 2013).

1.1.2d Acumulación de carotenoides en frutos de cítricos

Los cítricos son una fuente compleja y diversa de carotenoides con una concentración y composición que difiere en forma importante entre variedades, especies e incluso entre partes del fruto (Kato, 2012; Wei et al., 2017). En los cítricos, se han identificado más de 115 carotenoides diferentes, responsables de la coloración externa e interna de los frutos (Alquézar et al., 2008; Wei et al., 2017). Los frutos cítricos, en general, acumulan mayor contenido de carotenoides en el flavedo (cáscara) que

en la pulpa y, si bien la coloración depende del contenido total de carotenoides, los colores observados se correlacionan directamente con la acumulación de carotenoides específicos (Alquézar et al., 2008).

El color de las mandarinas (como Satsuma -*Citrus unshiu*-) se debe a la acumulación de β -criptoxantina tanto en flavedo como en pulpa; en las naranjas (como Valencia -*C. sinensis*-) el color observado se corresponde con una mayor acumulación de 9-*cis*-violaxantina, mientras que el color amarillo claro en la pulpa del limón (como Lisbon -*C. limon*-) se debe al bajo contenido de carotenoides totales (Kato, 2012). La coloración anaranjada más intensa del flavedo de mandarinas se debe, además, a la acumulación de apocarotenoides como β -citraurina y β -citraurinene. También se observa en mandarinas una marcada diferencia en la composición de carotenoides entre pulpa y flavedo (Alquézar et al., 2008).

La gran diversidad de carotenoides observada en frutos de cítricos se debe, en gran medida, a la expresión diferencial de distintas enzimas clave de la ruta de síntesis de carotenoides. Algunos genotipos presentan la ruta plenamente activa, mientras que otros presentan ciertos pasos o etapas inactivas (Fanciullino et al., 2006). La enzima licopeno β ciclasa 2 (β LICY2) específica de cromoplastos es clave en el catabolismo del licopeno y, por ende, ha sido estudiada en detalle, especialmente en mutantes coloreados (Alquezar et al., 2008; Alquezar et al., 2009; Mendes et al., 2011; Alquezar et al., 2013; Lu et al., 2016a; Lu et al., 2016b). Así, se han identificado al menos dos alelos que poseen diferentes niveles de actividad enzimática. El alelo a (β LICY2a) es más eficiente en la conversión de licopeno en β -caroteno mientras que el alelo b (β LICY2b) tiene una actividad casi nula (Alquezar et al., 2009; Lu et al., 2016b). Ensayos de mutagénesis dirigida identificaron como críticas para la función de esta enzima la sustitución del ácido aspártico por una valina en la posición 72 y de la glicina por una serina en la posición 359 (Lu et al., 2016b). En el limón, el alelo descrito posee una valina en la posición 72 y una serina en la posición 359 y se ha observado que es eficiente en la conversión de licopeno en β -caroteno (Zhang et al., 2012a; Lu et al., 2016b).

La acumulación de licopeno en cítricos se observa excepcionalmente en mutantes de naranjas, pomelos, toronjas y limón, ya sea en la piel o la pulpa. Para naranjas (*C. sinensis*) se han descrito los mutantes rojos Cara Cara, Shara, Hong Anilu y Sanguínea de Mombuca, entre otros (Liu et al., 2007; Alquézar et al., 2008; Nishimura et al., 2012). Algunas de las variedades de pomelo (*C. paradisi*) de coloración roja que se conocen son Marsh Pink, Ruby Red, Star Ruby y Rio Red (Xu et al., 2006; Chaudhary et al., 2016). En el caso de toronja (*C. grandis*) se conocen mutantes rojos como Chuhong y Chuzhou Early Red (Xu et al., 2006; Liu et al., 2015a; Liu et al., 2016). En limones (*C. limon*), se conoce el mutante Pink Lemon, una mutación espontánea del limón Eureka (Lana et al., 2020).

Los mecanismos por los que acumulan licopeno varios de estos mutantes son diferentes. En las naranjas, Cara Cara tiene mayores niveles de precursores de carotenoides que favorecen la acumulación de carotenoides totales y un aumento en los niveles de expresión de las enzimas de la ruta (Tao et al., 2007; Alquezar et al., 2008). El mutante Hong Anilu, sin embargo, se caracteriza por tener un aumento en la expresión de genes carotenogénicos del comienzo de la ruta y una disminución en la expresión de los genes del final de la ruta (Liu et al., 2007; Xu et al., 2009). Además, este mutante presenta un alelo defectuoso para la enzima β LICY2 (Lu et al., 2016b). En la variedad Sanguínea de Mombuca se han descrito mayores niveles de expresión génica para varias enzimas de la ruta de síntesis de carotenoides en pulpa (Nishimura et al., 2012). En los pomelos, el mutante Star Ruby se estudió en detalle. Este mutante presenta una reducción en la expresión de los genes β LICY2 y β CHX en comparación con la variedad Marsh, que no acumula licopeno. Sin embargo, ambas variedades presentan un alelo con actividad casi nula de la enzima β LICY2 (β LICY2b), pero los alelos a y b se transcriben en proporciones similares, tanto en el pomelo Star Ruby como en el Marsh (Alquézar,

2007; Alquezar et al., 2013). Las toronjas han sido menos estudiadas, pero se conoce que el mutante rojo de toronja Guanxi, tiene niveles de expresión elevados de las enzimas involucradas en la síntesis de precursores de carotenoides, así como menores niveles de expresión de enzimas que actúan a continuación de la acumulación de licopeno. Además, se identificaron alelos diferentes para la β LCY2 entre el parental y el mutante rojo (Liu et al., 2016). Por su parte, en el limón Pink, se estudió la expresión génica de los genes de rutas de precursores de carotenoides, de la ruta de carotenoides, de la biosíntesis de ABA y de otros genes relacionados con la acumulación de carotenoides. En este mutante se observó que la expresión de genes de precursores de carotenoides y de la síntesis de licopeno es más activa, mientras que la expresión de las enzimas que lo catabolizan está reprimida. También se observó un aumento en la expresión de genes relacionados con la acumulación de carotenoides pero que no forman parte de la ruta de biosíntesis como algunas proteínas de *heat shock*, Fibrilinas y la proteína Orange (Lana et al., 2020).

1.1.2e Los carotenoides y su relación con la calidad de fruta

Como se mencionó al comienzo de la introducción, los aspectos que definen la calidad de fruta dependen de la especie y las exigencias del mercado donde el fruto es comercializado y consumido. Algunas variables muy importantes son el color, la firmeza, la composición nutricional, con énfasis en compuestos beneficiosos para la salud, y el comportamiento durante la poscosecha.

Tanto en tomates como en cítricos, el color del fruto está directamente relacionado con el tipo carotenoide (o combinaciones) que predominan y con su contenido (Lado et al., 2016b). Así, cuanto mayor sea el contenido de licopeno en un fruto de tomate, más intenso será su color rojo. También tienen color rojo los mutantes de cítricos en los que predomina el licopeno entre los carotenoides presentes (Alquezar et al., 2008; Alquezar et al., 2009; Alquezar et al., 2013). El contenido de carotenoides está también asociado con propiedades que benefician la salud del consumidor como, por ejemplo, carotenoides que poseen actividad provitamina A o alta capacidad antioxidante (Ma et al., 2020; Maoka, 2020). También se ha relacionado un mayor contenido de licopeno en la piel de pomelos con una mayor tolerancia al daño por frío durante el almacenamiento poscosecha (Lado et al., 2015b; Lado et al., 2016a).

1.2 Mejoramiento genético con énfasis en calidad de fruta y carotenoides

Algunas de las especies cultivadas que consumimos en la actualidad son el resultado de más de 10000 años de domesticación; este proceso, fue una intervención radical en la evolución realizada por el hombre y es la base de las sociedades modernas. Los esfuerzos de los programas de mejoramiento genético de frutas y hortalizas por obtener cultivares con mayor rendimiento, buen comportamiento poscosecha, tamaño y firmeza, entre otros caracteres, resultaron, en varios casos, contraproducentes en lo que refiere a atributos organolépticos como el aroma, relacionados directamente con el sabor, que influyen en la percepción y aceptabilidad de los consumidores (Ulrich and Olbricht, 2011; Gascuel et al., 2017). En las últimas décadas, debido a la creciente demanda de consumidores y mercados, los programas de mejoramiento genético de frutas y hortalizas han rediseñado sus objetivos para lograr obtener frutos con mayor calidad organoléptica, valor nutricional y conservación poscosecha, sin dejar de lado los atributos favorables para la producción (rendimiento, adaptación al sistema productivo, resistencia a enfermedades y tolerancia a estrés abiótico) (Deng et al., 2011).

1.2.1 Mejoramiento convencional enfocado a variedades de tomate y citrus con mayor contenido de carotenoides

Tanto en tomate como en citrus, se han realizado esfuerzos en mejoramiento genético para obtener cultivares con mayor contenido de licopeno. Existen abordajes de mejoramiento genético clásico, de transgénesis y, recientemente, se ha abordado este objetivo utilizando la edición génica.

1.2.1a Tomate

Los programas de mejoramiento genético de tomate buscan mejorar la calidad de los frutos, incluyendo su valor nutricional, sin dejar de lado el rendimiento, adaptación y resistencia a enfermedades (Stommel, 2006; Causse et al., 2011). Existen diferentes alternativas para mejorar la contribución de hortalizas a la nutrición humana, que incluyen: incrementar significativamente los nutrientes, mejorar la calidad del fruto para promover un mayor consumo, mejorar el cultivo para obtener mayor producción y disponibilidad, y reducir la estacionalidad. El valor nutritivo del fruto de tomate está influenciado por los cultivares disponibles (genotipos) y también por el ambiente de producción y las condiciones poscosecha (Stommel, 2006; Cebolla-Cornejo et al., 2013; Verheul et al., 2015; Leiva-Brondo et al., 2016). Para obtener mayor contenido de carotenoides a través del mejoramiento genético se necesita identificar o generar genotipos con alto potencial para acumular carotenoides, transferir los genes que controlan este carácter a líneas de mejoramiento y, finalmente, evaluar el comportamiento de los genes introgresados en el nuevo "background" genético y seleccionar los genotipos elite que tengan el comportamiento agronómico deseado y un alto contenido de carotenoides.

El mejoramiento genético convencional se alimenta de genotipos con diferentes atributos para lograr las combinaciones alélicas que generan el producto deseado. Existen numerosos mutantes naturales de la ruta de carotenoides que se han utilizado en los programas de mejoramiento genético de tomate, con el fin de obtener variedades con mayor contenido de licopeno o con un perfil diferente de carotenoides. Los mutantes espontáneos de tomate se han identificado, en su mayoría, en especies emparentadas con el tomate y estas mutaciones han sido introgresadas en líneas de tomate cultivado. Un ejemplo son las variedades comerciales Caro-Red y Caro-Rich, de frutos anaranjados, que contienen alto contenido de β -caroteno porque tienen las mutaciones *beta* (*B*) y *modificador beta* (*mo_B*), que promueven la conversión de licopeno en β -caroteno por la acción de la enzima licopeno β ciclasa (CYC-B) (Tomes and Quackenbush, 1958; Tigchelaar and Tomes, 1974). Sin embargo, estas variedades, consideradas actualmente "heirloom tomatoes", no tuvieron suficiente aceptación por los consumidores de la época, que preferían tomates rojos (Cebolla-Cornejo et al., 2013). Otras mutaciones que se han utilizado en mejoramiento genético son las mutaciones *old gold* y *old gold crimson* (*og* y *og^c*, respectivamente). Ambas mutaciones surgieron en *Solanum lycopersicum*, el tomate cultivado, y producen el mismo resultado: una mayor acumulación de licopeno porque éste no es transformado a β -caroteno debido a que la enzima CYC-B codificada por estos mutantes no es funcional (Ronen et al., 2000). Las mutaciones *og* y *og^c* han sido utilizadas en variedades comerciales para consumo en fresco como los híbridos Tasty Lee y Solar Dancer (Scott et al., 2008; Hutton et al., 2020). Estas mutaciones tienen la limitación de haber surgido en genotipos que portan la mutación *sp* en el locus SELF-PRUNING y, por ende, esos genotipos tienen hábito de crecimiento determinado (Pnueli et al., 1998). El hecho de que el locus *SELF-PRUNING* se encuentre en el cromosoma 6 del genoma de tomate, a una distancia de tan solo 6 cM del locus *Beta* (que codifica la proteína CYC-B), dificulta sustancialmente la obtención vía cruzamientos, de genotipos portadores de las mutaciones *og* u *og^c* junto con el alelo *Sp wild type*, a tal punto que no hay disponibles en el mercado variedades

de tomate con estas características. Es importante tener en cuenta que, cuando no hay mutaciones naturales disponibles en el germoplasma, muchos programas de mejoramiento genético han recurrido al empleo de estrategias de mutagénesis química para generar la variabilidad deseada. Existen colecciones de mutantes obtenidos por mutagénesis química en diferentes contextos genómicos y con diferentes propósitos, como la colección de mutantes del cv. MicroTom que se utiliza para estudios genéticos, y las colecciones obtenidas en los cultivares Red Setter y Moneymaker, que tienen potencial uso en programas de mejoramiento genético (Watanabe et al., 2007; Minoia et al., 2010; Fonseca et al., 2022).

1.2.1b Citrus

Los programas de mejoramiento genético de citrus, enfocados a variedades para consumo en fresco, consideran características de calidad externa (forma del fruto, firmeza, piel de color intenso, lisa y brillante) tanto como características de calidad interna (fácil pelado, sabor y aroma agradables, ausencia de semillas y color) (Deng and Xu, 2011; Abouzari et al., 2016).

Los cítricos se encuentran entre los frutos más consumidos a nivel mundial y son ricos en diversidad y contenido de carotenoides. Por este motivo se han realizado esfuerzos en mejoramiento genético para obtener nuevas variedades que acumulen este tipo de pigmentos en frutos. Se han realizado prospecciones de mutantes espontáneos, selecciones de mutaciones inducidas por radiación o química, mutaciones somaclonales e hibridaciones sexuales. En general, las nuevas variedades se han obtenido de prospecciones en campo de mutantes con mayor coloración en fruto debido a la acumulación de diversos carotenoides (Deng and Xu, 2011).

La especie de citrus con el mayor número de mutantes coloreados que acumulan altos niveles de carotenoides es el pomelo (*C. paradisi*). Existen en el mercado numerosas variedades de pomelos rojos. Las primeras variedades de pulpa roja surgieron como mutaciones espontáneas. Posteriormente realizaron mejoramiento por irradiación para obtener variedades de coloración más intensa y sin semillas (Abouzari et al., 2016). En la actualidad el programa de mejoramiento de Texas A & M Citrus Center comercializa variedades de pomelo rojo de las categorías Rio Star®, Ruby-Sweet® y Flame (<http://www.texasweet.com/texas-grapefruits-and-oranges>).

Además de los pomelos existen variedades comerciales de naranja y toronja que acumulan carotenoides y tienen color rojo en la pulpa. Las variedades de naranja coloreadas Cara Cara, Hong Anliu y Sanguínea de Mombuca surgieron como mutaciones espontáneas en Venezuela, China y África, respectivamente (Liu et al., 2007; Alquezar et al., 2008; Nishimura et al., 2012). Las toronjas de pulpa coloreada, en su mayoría, han sido obtenidas como mutantes espontáneos en prospecciones en China. Algunos ejemplos son "Fengdu red flesh pummelo", "Guanxi sweet pummelo red mutant", "Shuitu seedless red pummelo". Únicamente se han encontrado mutantes que acumulan licopeno en pomelos, naranjas, toronjas y limón. Por el contrario, a la fecha no se han reportado mutantes de mandarinas que acumulen este pigmento (Xu et al., 2006; Deng and Xu, 2011).

1.2.2 Ingeniería genética y mejoramiento de precisión enfocado a variedades con mayor contenido de carotenoides

El descubrimiento en las últimas décadas de los genes involucrados en la biosíntesis, catabolismo y almacenamiento de carotenoides ha permitido manipular su ruta de biosíntesis en varias especies de plantas cultivadas utilizando ingeniería genética, con el fin de obtener productos con mayor contenido de carotenoides. Entre las diversas estrategias utilizadas para lograr el aumento de determinados

carotenoides, se encuentran: i) el incremento en el flujo de la ruta metabólica a través de la sobreexpresión de genes de pasos limitantes de la ruta; ii) el silenciamiento génico o la generación de mutantes *knockout*, para disminuir o suprimir una determinada rama de la ruta de síntesis en favor de la otra o bien bloquear pasos del catabolismo para limitar la conversión de determinado carotenoide en otros compuestos; y iii) el incremento de la capacidad de sumidero mediante la creación de estructuras de almacenamiento (Morelli and Rodriguez-Concepcion, 2023). El Arroz Dorado, un arroz genéticamente modificado rico en β -caroteno, fue aprobado en 2021 para su cultivo y comercialización en Filipinas, convirtiéndose en el único cultivo biofortificado de este tipo en obtener dicha autorización. (Wu et al., 2021). Ejemplos de cultivos con mayores contenidos de carotenoides en frutos, utilizando la estrategia de sobreexpresión de genes, son la Banana Dorada, una banana Cavendish que sobreexpresa la enzima PSY de una banana silvestre rica en β -caroteno (Paul et al., 2017); o tomates que sobreexpresan un gen para licopeno β ciclasa y acumulan β -caroteno (D'Ambrosio et al., 2004). Alternativamente, se han obtenido tomates con mayor contenido de carotenoides totales mediante la sobreexpresión de la proteína ORANGE, que por un lado estabiliza la proteína PSY1, y por otro lado, induce la formación de cromoplastos, aumentando así la capacidad de sumidero del fruto (Yazdani et al., 2019). También se han obtenido naranjas que acumulan β -caroteno mediante el silenciamiento del gen que codifica para la enzima β caroteno hidroxilasa (Pons et al., 2014) o bananas que acumulan β -caroteno debido a la generación de mutantes *knockout* para la licopeno ϵ ciclasa, utilizando edición génica (Kaur et al., 2020).

El tomate es uno de los frutos utilizados como modelo para estudiar la biosíntesis de carotenoides. En consecuencia, se conocen los genes que codifican las enzimas de esta ruta y muchos de ellos se han modificado utilizando ingeniería genética clásica o mejoramiento de precisión (edición génica, por ejemplo). Así, se han sobreexpresado en tomates genes endógenos, así como de bacterias y de otras especies vegetales, que codifican enzimas clave de la ruta de síntesis de carotenoides. Por ejemplo, el desarrollo de tomates que sobreexpresan la enzima licopeno β ciclasa o la proteína ORANGE (D'Ambrosio et al., 2004; Yazdani et al., 2019) y la sobreexpresión de varios genes en simultáneo con promotores específicos de fruto para aumentar el contenido de luteína y zeaxantina (Wu et al., 2022). También se han sobreexpresado genes de *A. thaliana* (β LCY o PDS), narciso (β LCY) y citrus (β CHX y β LCY) (Rosati et al., 2000; Guo et al., 2012; McQuinn et al., 2018; Karniel et al., 2020; Mi et al., 2022), así como genes de la bacteria *Erwinia uredovora* que codifican para fitoeno sintasa, fitoeno desaturasa o licopeno β ciclasa (Fraser et al., 2001; Mi et al., 2022). Otra herramienta ampliamente utilizada ha sido el silenciamiento de genes endógenos, ya sea a través de transgénesis o utilizando silenciamiento inducido por virus (VIGS). Estas estrategias se han utilizado para dilucidar las funciones de genes candidatos (Fantini et al., 2013) o directamente para incrementar el contenido de licopeno (Ma et al., 2010).

Por su parte, los cítricos son el grupo de frutos con mayor diversidad en carotenoides presentes, por lo que, al igual que el tomate, también han sido estudiados extensivamente. Sin embargo, al ser especies leñosas de crecimiento lento y difícil transformación genética, el abordaje más común para caracterizar genes candidatos de la ruta de síntesis de carotenoides es la sobreexpresión de genes de cítricos en otras especies de más fácil transformación o manejo como, por ejemplo, el tomate (Guo et al., 2012; Zhu et al., 2020b). Otra herramienta que ha sido utilizada para evaluar la actividad de las enzimas como las LCY es la complementación heteróloga en bacterias carotenogénicas (Alquezar et al., 2009; S. Lu et al., 2016; Misawa & Shimada, 1998; NIKLITSCHKE et al., 2008; L. Zhang et al., 2012). También existen ejemplos donde se sobreexpresan genes de citrus en especies emparentadas de otros géneros, como el quinoto (*Fortunella hindisii*) (Zhang et al., 2009). Adicionalmente, se ha silenciado el

gen de la β -caroteno hidroxilasa en naranja y se ha observado un aumento de 36 veces en el contenido de β -caroteno en los frutos transgénicos (Pons et al., 2014).

1.2.2a Edición génica: mejoramiento de precisión para manipular la ruta de síntesis de carotenoides

La edición génica, en particular el sistema CRISPR-Cas9, es una herramienta de mutagénesis dirigida que ha ganado importancia en el mejoramiento genético vegetal en la última década desde su primera utilización exitosa en plantas en 2013 (Jinek et al., 2012; Jiang et al., 2013; Nekrasov et al., 2013; Shan et al., 2013). Brevemente, este sistema se basa en un mecanismo de defensa inmune adaptativo presente en la bacteria *Streptococcus pyogenes* y otras especies cercanas, y su adaptación para reconocer y generar un corte doble hebra en secuencias específicas de ADN. El sistema utiliza la nucleasa (Cas9) formando un complejo con una molécula de ARN guía (o *single guide RNA*, *sgRNA*), el cual guía a Cas9 hacia la secuencia de interés para introducir un corte doble hebra. CRISPR-Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (SpCRISPR-Cas9) pertenece a los sistemas CRISPR tipo II A, que utilizan en las bacterias que los presentan, dos moléculas de ARN para formar un complejo con la nucleasa Cas9. Uno de ellos, el ARN crispr (crRNA), es el que confiere especificidad de secuencia a Cas9, mientras que la otra molécula de ARN (transactivador; tracrRNA), le otorga estabilidad al complejo y es requerido para activar a Cas9 (Jinek et al., 2012). Este sistema fue adaptado para su uso en mutagénesis dirigida mediante el diseño de un único ARN (el ARN guía) que combina propiedades del crRNA con el tracrRNA, y puede ser modificado para que el corte doble hebra se realice en una secuencia de interés (Jinek et al., 2012).

Se han descrito numerosos sistemas CRISPR-Cas en bacterias y arqueas, estos sistemas se han clasificado en dos Clases y varios tipos. La Clase 1, que incluye a los tipos I, III y IV, utiliza varias proteínas Cas para formar un complejo con el crRNA mientras que en la Clase 2, que incluye a los tipos II, V y VI, solamente una proteína Cas forma el complejo con el crRNA (Koonin et al., 2017). Una de las particularidades del sistema CRISPR-Cas9, que puede ser una limitante en algunos casos, es el requerimiento de la secuencia PAM (Protospacer Adjacent Motif) que debe estar presente en la cercanía del sitio en el cual se quiere generar una mutación. En el caso de la Cas9, dicha secuencia es NGG y se tiene que ubicar inmediatamente en dirección 3' del sitio blanco. Alternativamente, se pueden utilizar otras proteínas Cas con diferentes tipos de secuencias PAM como por ejemplo las proteínas Cas12a o Cas12b, que utilizan secuencias PAM ricas en AT. Además, las proteínas Cas12 dejan extremos cohesivos luego del corte, lo que puede ser beneficioso para ciertas aplicaciones como el reemplazo alélico por recombinación homóloga (Zetsche et al., 2015; Koonin et al., 2017). Otras proteínas Cas, como por ejemplo Cas13a y Cas13b tienen como molécula blanco de corte ARN simple hebra, por lo que su uso no modifica el ADN genómico, sino que directamente disminuye los niveles de una molécula específica de ARN (Cox et al., 2017; Koonin et al., 2017).

La generación de mutaciones vía CRISPR-Cas ocurre gracias a que luego de generado el corte doble hebra, la célula activa mecanismos de reparación de ADN, algunos de los cuales pueden ser propensos a cometer errores. Estos mecanismos de reparación pueden ser de dos tipos: 1) el mecanismo de unión de extremos no homólogos (NHEJ: non-homologous end joining), que suele generar pequeñas deleciones, inserciones o cambio de bases, y 2) el mecanismo de reparación dirigida por homología (HDR: homology directed repair) que repara la rotura utilizando recombinación homóloga cuando hay disponible una molécula de ADN homólogo para utilizar como molde (Iqbal et al., 2020). La reparación del daño en el ADN vía NHEJ puede generar cambios en el marco de lectura de un gen y resultar en la obtención de alelos con pérdida de función. La reparación vía HDR no comete errores, pero permite introducir cambios específicos en la secuencia del ADN.

En plantas, se utilizan principalmente dos estrategias para generar mutaciones utilizando el sistema CRISPR-Cas9. Una de ellas es realizar una transformación estable, en cuyo caso, el ADN incorporado al genoma de la planta incluye un *cassette* de selección, la secuencia codificante de Cas9 y un *cassette* para la transcripción de el/los ARN guía/s. Luego de obtenidas plantas resistentes en medio selectivo y de seleccionar las mutantes para el gen de interés, es posible eliminar la construcción génica mediante autofecundación o retrocruzamientos seleccionando, en las progenies segregantes, plantas mutadas y libres de transgén. La segunda estrategia es utilizar sistemas “libres de ADN” donde se utilizan ribonucleoproteínas preensambladas (Cas9+ARNguías) o moléculas de ARN mensajero de Cas9 y de los ARN guías que son transfectadas en protoplastos o bombardeadas en tejido vegetal para que se generen las mutaciones deseadas en el gen de interés. Luego se regeneran plantas y se busca entre ellas las que porten las mutaciones deseadas (Wada et al., 2020). De esta forma, utilizando cualquiera de estas dos estrategias, es posible obtener plantas mutantes no transgénicas y, por ende, podrían estar exentas de someterse a los mismos procesos de regulación que deben cumplir los cultivos transgénicos (Zaman et al., 2023).

Además del uso tradicional del sistema CRISPR-Cas9, han surgido nuevas herramientas con variantes de Cas9 que permiten una serie de nuevas aplicaciones, entre ellas generar una rotura simple hebra, unirse al ADN sin cortarlo y producir modificaciones dependientes de otras enzimas fusionadas a Cas9 (cambios epigenéticos como metilación de ADN, modificación de bases nitrogenadas específicas, etc.) (Zhu et al., 2020a; Li et al., 2023; Zaman et al., 2023).

Desde la primera aplicación exitosa de CRISPR-Cas9 en plantas en 2013, han surgido un sinnúmero de trabajos científicos que reportan la utilización de estas herramientas en plantas, donde se han modificado genes relacionados con diversos caracteres, desde tolerancia a estrés biótico, abiótico, arquitectura de planta, tolerancia a herbicidas y caracteres relacionados con la calidad del producto (granos o frutos) (Khan et al., 2022; Ricoch et al., 2024; Zhang and Zhu, 2024).

En cuanto a la ruta de síntesis de carotenoides existen varios ejemplos donde se han modificado diferentes genes que son parte de la ruta, así como genes involucrados en la regulación de éstos o de las rutas precursoras en diferentes especies vegetales utilizando este sistema o alguna de sus variantes. Se ha logrado insertar en un lugar específico del genoma de arroz el *cassette* para *CrtI* y *PSY* de maíz bajo el control de un promotor específico para endosperma (Dong et al., 2020). También en arroz, se realizó el reemplazo alélico por HDR inducida por CRISPR-Cas9 de la enzima LCYE wt por el alelo que lleva el “Golden SNP”, incrementando el contenido de carotenoides en los callos obtenidos (Kim et al., 2022). Además, se ha generado una banana con una mutación *knockout* para la enzima LCYE que acumula alto contenido de β -caroteno (Kaur et al., 2020). Otro ejemplo es la generación de mutantes *knockout* para varios genes en simultáneo en tomate, *SGR1* (que es un regulador negativo de la síntesis de carotenoides) y las ϵ y β licopeno ciclasas (que transforman en licopeno en α y β -caroteno); de esta forma se promueve la síntesis de licopeno a la vez que se bloquea su catabolismo (Li et al., 2018). Finalmente, en varias especies de frutales u hortalizas como manzana, kiwi, sandía, melón, frutilla y citrus, se ha optimizado el proceso de edición mediante CRISPR-Cas9 generando mutaciones *knockout* en el gen que codifica la enzima fitoeno desaturasa (PDS), que genera fenotipos albinos y simplifica la identificación de mutantes (Dongariyal et al., 2023).

En tomate, se han realizado numerosos trabajos que manipulan la síntesis de carotenoides a través de edición génica basada en CRISPR-Cas9 o sus variantes. Los primeros trabajos fueron reportados en 2018, uno de ellos se mencionó en el párrafo anterior, y combina la promoción de la ruta de síntesis mediante la inactivación de un regulador negativo (SGR1) y el bloqueo del catabolismo del licopeno bloqueando las licopeno ciclasas (α y β) presentes en el genoma (CYC-B, ϵ LCY, β -LCY1 y β lc) (Li et al.,

2018). Una limitante de este trabajo es que al bloquear licopeno ciclasas que no son específicas del fruto se pueden generar efectos pleiotrópicos en otros órganos de la planta. Otro de estos trabajos, utiliza el sistema CRISPR-Cas9 para simular la domesticación del tomate silvestre mediante la mutación de varios genes de domesticación que resultan en fenotipos similares a los del tomate cultivado (Zsögön et al., 2018). Entre los genes modificados se encuentra el que codifica para la licopeno β ciclasa específica de fruto, CYC-B, que transforma el licopeno en β -caroteno durante la maduración (Ronen et al., 2000). También en 2018, se generaron mutantes *knockout* para la enzima PSY1 y la β -caroteno hidroxilasa (β CHX), así como reparaciones en mutaciones de los genes de la Caroteno Isomerasa (CRTISO) y la PSY1 utilizando recombinación homóloga (HDR) inducida por CRISPR-Cas9 (Dahan-Meir et al., 2018; D'Ambrosio et al., 2018). Otros trabajos han generado mutaciones de pérdida de función en genes reguladores de la biosíntesis de carotenoides (DDB1, DET1, WRKY35, SNAC9 y HY5) utilizando el sistema CRISPR-Cas tradicional o edición de bases (Hunziker et al., 2020; Wang et al., 2021; Yang et al., 2022; Yuan et al., 2022; Feng et al., 2023); también se generó una delección en la región 5'UTR de la CRTISO que resulta en una disminución en la conversión de prolicopeno a licopeno (Lakshmi Jayaraj et al., 2021). Además, utilizando la estrategia convencional de CRISPR-Cas9 se generaron mutantes *knockout* en genes de la ruta del MEP (GPPS) o genes que utilizan carotenoides como sustrato para sintetizar apocarotenoides como estrigolactona (CCD8) (Bari et al., 2019; Barja et al., 2021). Por otra parte, se optimizó la herramienta de prime editing editando el gen que codifica la PDS1 (Lu et al., 2021). Sin embargo, los trabajos mencionados utilizan cultivares modelo de tomate, como 'Micro-Tom' o 'Alisa Craig', y no tienen como objetivo generar un producto tecnológico que pueda ser incorporado en programas de mejoramiento para obtener cultivares comerciales. Al momento, solamente existe un tomate comercial obtenido por edición génica que contiene altos contenidos de GABA en el fruto y se comercializa, al momento, en Japón, donde fue desarrollado (Ezura, 2022).

En cítricos, el sistema CRISPR-Cas9 fue utilizado exitosamente en 2014 por primera vez mediante expresión transitoria en naranja y pomelo donde se obtuvieron mutaciones *knockout* del gen que codifica la enzima PDS (Jia and Wang, 2014a; Jia and Wang, 2014b). En años posteriores, los trabajos se han enfocado principalmente en obtener plantas de cítricos tolerantes al cancro bacteriano mediante la eliminación de un sitio de unión de un efector bacteriano en el promotor del gen CsLOB1 en naranja, pomelo y toronja (Jia et al., 2016; Jia et al., 2017b; Peng et al., 2017; Huang et al., 2020; Jia and Wang, 2020; Huang et al., 2022a; Jia et al., 2022a). Además, se ha optimizado el sistema de edición mediante la utilización de diferentes promotores (Peng et al., 2017; Zhang et al., 2017; Huang et al., 2022a) o proteínas Cas de otro tipo (Jia et al., 2017a; Jia et al., 2019; Jia et al., 2022b). También se ha utilizado la edición de bases en pomelo y naranja para modificar la caja TATA a CACA del promotor de CsLOB1 y para generar plantas del citrange Carrizo libres de transgenes (T-DNA) tolerantes a herbicida, modificando el gen que codifica la enzima ALS (Alquézar et al., 2022; Huang et al., 2022b). Recientemente se obtuvieron plantas de naranja libres de T-DNA resistentes al cancro utilizando ribonucleoproteínas de Cas12/crRNA para modificar el gen CsLOB1. Estas plantas cuentan con la aprobación de APHIS (Animal and Plant Health Inspection Service) y están exentas de la evaluación por el EPA (Environmental Protection Agency) en Estados Unidos y serán liberadas en ese país una vez completada la evaluación agronómica de la nueva variedad (Su et al., 2023). Además de los genes *CsLOB1*, *CsPDS* y *CsALS*, también se han modificado con esta herramienta otros genes relacionados con la tolerancia a cancro como *CsWRKY22* y *CsDMR6* (Wang et al., 2019; Parajuli et al., 2022) y genes que tienen que ver con la arquitectura de la planta como *CsTAC1* (Dutt et al., 2022). En cuanto a la ruta de síntesis de carotenoides, además de generar mutantes del gen *CsPDS* para optimizar la herramienta, solamente se ha utilizado el sistema CRISPR-Cas9 para generar mutantes *knockout* de la enzima Licopeno β -ciclasa 2 (*CsLCY β 2*) específica de frutos en el citrange "Carrizo" y en naranjas sanguíneas (Tarocco y Sanguigno), que producen antocianinas en sus frutos (Salonia et al., 2022). En

ese trabajo se obtuvieron plantas transgénicas editadas que serán evaluadas cuando comiencen a fructificar, para la acumulación de antocianinas y licopeno en frutos.

En Uruguay, se promulgó el 12 de marzo de 2024 el Decreto N°84/024, que establece los mecanismos por los cuales se determina si un producto obtenido por nuevas técnicas de mejoramiento genético (NBTs, del inglés New Breeding Tools) se encuentra o no alcanzado por la regulación aplicable a los organismos genéticamente modificados (OGM) (<https://www.impo.com.uy/bases/decretos/84-2024>). En este contexto, se conformó un Grupo Técnico de Trabajo (GTT), liderado por los Ministerios de Ambiente (MA) y de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP), encargado de determinar, de forma objetiva y con criterios científicos, si un producto u organismo generado por las NBT debe ser considerado dentro de la regulación aplicable a los OGM. La promulgación de este decreto sitúa a Uruguay dentro del conjunto de países con una reglamentación definida para los organismos o productos generados con estas herramientas, y permite avanzar en la obtención de productos comerciales generados a partir de esta tecnología.

2. OBJETIVO GENERAL e HIPÓTESIS

2.1 Objetivo general

Contribuir al conocimiento de la ruta de síntesis de carotenoides en tomate y mandarina y generar, en ambas especies, nuevos alelos no funcionales de la enzima licopeno β ciclasa específica de frutos para promover la acumulación de licopeno.

Específicamente, el trabajo busca generar variantes de pérdida de función para licopeno β ciclasa mediante CRISPR/Cas9 en tomate y mandarina, determinar el perfil de expresión génica de algunas enzimas clave de la biosíntesis de carotenoides en tomate cultivado y silvestre (*PSY1*, *PSY2* y el gen *Solyc08g007440*) y en híbridos de mandarinas pertenecientes al programa nacional de mejoramiento genético (*PSY*, β *LCY2* y β *CHX*), y correlacionar estos datos con la acumulación de carotenoides.

2.2 Hipótesis de trabajo

La generación de mutaciones de pérdida de función en las enzimas licopeno β ciclasas específicas de fruto para tomate y mandarina, aumentará el contenido de licopeno en el fruto y mejorará su calidad. El mayor contenido de licopeno en los frutos aumentará la tolerancia a bajas temperaturas y mejorará la conservación de los frutos en frío.

Los genes ortólogos para *PSYs* (*PSY1* y *Solyc08g007440*) presentes en *S. pimpinellifolium* LA1589 podrían contribuir con el mayor contenido de licopeno en el fruto observado de esta especie y podrían incorporarse mediante introgresión asistida por marcadores moleculares en el tomate cultivado.

Los híbridos de mandarina A218, B475, B30 y M9 presentan diferencias en la ruta de síntesis de carotenoides y esto se ve reflejado en la capacidad de acumular carotenoides. Aquellos con mayor contenido de carotenoides serían los mejores candidatos para la edición génica.

2.4 Estructura de la tesis

Para facilitar la lectura, esta tesis se divide en capítulos:

Capítulo 1: Obtención de líneas elite de tomate con hábito de crecimiento indeterminado, acumulación temprana de licopeno y tolerantes al daño por frío poscosecha.

Capítulo 2: Caracterización de diferentes alelos y genes que codifican para la enzima fitoeno sintasa (PSY) en tomate (cultivado y silvestre) para determinar su relación con la acumulación de licopeno y su potencial uso en mejoramiento genético.

Capítulo 3: Caracterización de la biosíntesis de carotenoides en híbridos nacionales de mandarinas y generación de un alelo defectuoso de la enzima β LCY2 específica del fruto.

3. CAPÍTULO 1: Obtención de líneas elite de tomate con hábito de crecimiento indeterminado, acumulación temprana de licopeno y tolerantes al daño por frío poscosecha.

3.1 Introducción

Uno de los objetivos principales en los programas de mejoramiento genético de tomate es incrementar el contenido de licopeno en el fruto (Kinkade and Foolad, 2013). Como se mencionó en la introducción general (sección 1.1.2c), existen dos alelos no funcionales espontáneos de la proteína CYC-B (*old gold -og-* y *old gold crimson -og^c-*) que han sido utilizados en mejoramiento genético; un alelo generado por mutagénesis química (A949G) y tres alelos obtenidos por edición génica en cultivares modelo o especies emparentadas (Thomson et al., 1965; Ronen et al., 2000; Silletti et al., 2013; Li et al., 2018; Zsögön et al., 2018; Hunziker et al., 2020). Estos alelos recesivos de pérdida de función se originaron en genotipos de tomate que tienen hábito de crecimiento determinado.

El hábito de crecimiento en el tomate está controlado por el locus *SELF PRUNING* (*Solyc06g074350*), donde las plantas con crecimiento indeterminado tienen el alelo salvaje *SP* y las plantas que tienen crecimiento determinado poseen el alelo mutante *sp* (Pnueli et al., 1998; Kang et al., 2022). Las plantas con crecimiento determinado (*sp/sp*) se desarrollan vegetativamente hasta cierto punto, florecen y fructifican en un período corto de tiempo, lo que se refleja en una maduración sincronizada de los frutos, que se cosechan, también, en un período de tiempo acotado. Las plantas con crecimiento indeterminado (*SP/SP*) producen racimos de flores a medida que se desarrollan vegetativamente por lo que la fructificación y maduración de los frutos se da de forma escalonada, permitiendo varias cosechas en un período de tiempo prolongado (Figura 2a). El locus *Beta*, que codifica para la proteína CYC-B (*Solyc06g074240*) y el locus *SELF PRUNING* están ubicados en el cromosoma 6 separados por 6 cM de distancia, lo que hace que estén ligados (Figura 2b) (Tomato-EXPEN 2000, <https://solgenomics.net/cview/index.pl>).

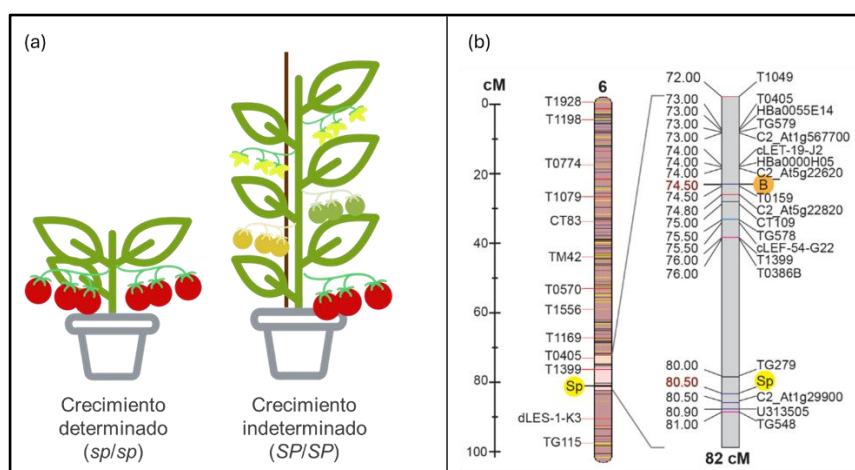


Figura 2. (a) Esquema de plantas de tomate con hábito de crecimiento determinado (*sp/sp*) e indeterminado (*SP/SP*) (b) Esquema que la distancia genética entre los loci *Beta* (B) y *SELF PRUNING* (Sp), adaptado del mapa Tomato-EXPEN 2000, <https://solgenomics.net/cview/index.pl>.

Los cultivares de tomate de hábito de crecimiento determinado (*sp/sp*) suelen utilizarse para la industria, así como para consumo en fresco. Sin embargo, la mayoría de los sistemas de producción para consumo en fresco utilizan cultivares con hábito de crecimiento indeterminado (*SP/SP* o *SP/sp*) con el fin de maximizar el rendimiento, obtener fruta con mejor calidad, facilitar el manejo del cultivo durante la cosecha y utilizar invernaderos para producir tempranamente (Csizinszky, 2005; Peet and Welles, 2005). Debido al ligamiento genético entre los alelos no funcionales de *CYC-B* y el alelo *sp*, los caracteres fenotípicos que resultan de estas combinaciones (alto contenido de licopeno y crecimiento determinado) no se han podido separar por cruzamientos convencionales (Pnueli et al., 1998; Causse and Grandillo, 2016). Esta es la principal razón por la cual los programas de mejoramiento genético de tomate no han logrado obtener plantas de hábito indeterminado con alto contenido de licopeno en sus frutos utilizando las mutaciones *og* y *og^c*.

El licopeno es un potente antioxidante que, en tejidos verdes elimina radicales libres generados durante la fotosíntesis y protege los componentes del cloroplasto del estrés oxidativo generado en este proceso (Khan et al., 2021). El fruto de tomate es sensible a las bajas temperaturas (tanto a campo como en poscosecha) y manifiesta daño por frío (DPF) cuando se expone a temperaturas menores a 13 °C (Rai et al., 2022). El DPF está asociado a la pérdida de permeabilidad de la membrana celular y acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS). Se ha reportado que el licopeno ejerce un rol protector durante el estrés por frío en pomelos rojos y esta función está relacionada con sus propiedades antioxidantes (Lado et al., 2016a). En ese contexto, es esperable que un aumento en el contenido de licopeno en fruto de tomate resulte en un incremento de la tolerancia al estrés por frío.

El sistema CRISPR/Cas9 ha sido utilizado en tomate para obtener frutos con perfiles de carotenoides diferentes o mayor contenido de licopeno mediante la edición de varios genes en simultáneo (Li et al., 2018; Zsögön et al., 2018; Hunziker et al., 2020). Aunque los trabajos mencionados han utilizado el gen *CYC-B* como blanco, ningún trabajo aborda la combinación de esta característica con plantas de crecimiento indeterminado. En consecuencia, todas las mutaciones para el gen *CYC-B* fueron generadas en genotipos de hábito de crecimiento determinado.

Combinar características que están genéticamente ligadas continúa siendo un reto para los programas de mejoramiento genético. En este capítulo, se utilizó el sistema CRISPR-Cas9 para romper el ligamiento genético que existe entre el crecimiento determinado (*sp/sp*) y el alto contenido de licopeno en fruto. Para lograrlo, se generaron alelos no funcionales para la proteína *CYC-B* en genotipos elite de tomate de hábito de crecimiento indeterminado (*SP/SP*). Los genotipos mutantes para *CYC-B* acumulan mayor contenido de licopeno en etapas tempranas de la maduración del fruto y además, son más tolerantes al daño por frío durante el almacenamiento poscosecha. Las líneas editadas obtenidas pueden ser incorporadas al programa de mejoramiento genético de tomate de INIA para generar cultivares para consumo en fresco con alto contenido de licopeno y posiblemente más tolerantes al daño por frío.

3.2 Objetivos específicos

- I. Generar alelos de pérdida de función del gen *CYC-B* en genotipos elite de tomate con hábito de crecimiento indeterminado.
- II. Caracterizar genotípica y fenotípicamente las líneas editadas.

3.3 Metodología

3.3.1 Material vegetal y condiciones de cultivo.

Para la transformación genética se utilizaron los genotipos de tomate (*S. lycopersicum*) con hábito de crecimiento indeterminado (alelo *SP*) LT16 y LT46 del programa de mejoramiento genético del INIA. Las semillas de tomate se esterilizaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 1 % y una gota de detergente comercial con agitación durante 15 minutos y se sembraron *in vitro* en medio MS a la mitad de la concentración suplementado con vitaminas B5 (Pino et al., 2010). Se mantuvieron en la oscuridad a 25 °C durante 7 días. Las plántulas se transfirieron a la luz (16 h de luz/8 h de oscuridad a 25 °C) durante dos días antes de la transformación de cotiledones y/o hipocótilos. La regeneración de las plantas se realizó bajo las mismas condiciones de luz/oscuridad y temperatura. Las plantas enteras se transfirieron a macetas y se cubrieron con bolsas de plástico durante 5-7 días. A continuación, la bolsa se abrió paulatinamente para evitar síntomas de deshidratación. Luego de removida completamente la bolsa, las plantas fueron trasladadas al invernadero de bioseguridad.

3.3.2 Diseño de ARN guías, evaluación de eficiencia *in vitro* y construcción de vectores.

Se identificaron dos ARN guías específicos para la secuencia codificante de la enzima licopeno β -ciclase (CYC-B) (*Solyc06g074240*), utilizando el software CRISPOR (Haeussler et al., 2016). Ambos sitios blanco están ubicados cerca del codón ATG en las posiciones + 41-61 (blanco 1) y +271-291 (blanco 2) (Figura 3a). La eficiencia *in vitro* de ambos ARN guías se evaluó en una región genómica de 3212 pb que se amplificó por PCR utilizando los cebadores Gen1 y Gen2 (Tabla 1) que contiene ambos sitios blanco, como se describe en Fleitas *et. al*, 2022. Los ARN guías se clonaron en el vector binario pDIRECT22C (Čermák et al., 2017) con el sistema Golden Gate. La construcción resultante (Cas9-SICYC-B-271-41) se introdujo en *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 y se utilizó para la transformación de plantas.

3.3.3 Transformación de plantas y detección de plantas transgénicas.

Se transformaron los genotipos de tomate LT16 o LT46 como se describe en Pino *et al.* (2010), con algunas modificaciones (Arruabarrena and Vidal, 2025). Brevemente, se prepararon segmentos de cotiledones y/o hipocótilos de aproximadamente 0,5 cm de plantas de 9 días de edad, los cuales se transfirieron a 50 mL de medio MS líquido suplementado con 1 mg/L de ribósido de zeatina *-all trans-* (Duchefa Biochemie) y se incubaron en la cámara de crecimiento de plantas con agitación suave durante 24 h. A continuación, se eliminó el medio líquido y los explantes se incubaron durante 20 min a 25 °C en la oscuridad a 80 rpm con una suspensión de *A. tumefaciens* LBA4404-Cas9-SICYC-B-271-41 en MS líquido (OD₆₀₀= 0,3-0,4), pretratada durante 25 min con acetosiringona 100 μ M (Sigma-Aldrich). Se eliminó la suspensión bacteriana y los explantes se secaron en papel de filtro estéril, se colocaron en MS semisólido suplementado con acetosiringona 100 μ M y 1 mg/L de ribósido de zeatina y se co-incubaron a 25 °C en la oscuridad durante 24 h. Los explantes se transfirieron a medio MS selectivo que contenía 50 μ g/mL de kanamicina (PhytoTech Labs) y 250 μ g/mL de timentina (PhytoTech Labs). Los explantes vivos se sub-cultivaron cada 4 semanas hasta que se regeneraron plantas completas resistentes a la kanamicina. Se extrajo ADN genómico de hojas de las plantas de tomate resistentes a kanamicina utilizando el método del citrato de sodio (Arruabarrena et al., 2016). Se confirmó la inserción del T-DNA mediante la amplificación por PCR del *cassette* de ARN guías utilizando los cebadores G+H (Tabla 1, Figura 4a). Las condiciones de las PCR fueron las siguientes: 100-200 ng de ADN, 1x Mango Mix (Bioline, Meridian Bioscience, EE. UU.), 0,25 μ M de cada cebador y

agua de grado PCR hasta un volumen de 20 µL. Las condiciones de ciclado fueron 95 °C durante 3 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C durante 30 s, 52 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s y un paso final de extensión a 72 °C durante 60 s.

3.3.4 Detección de mutaciones del gen *CYC-B* en las progenies T0 y T1.

Se extrajo ADN genómico de hojas de las plantas de tomate T0 y T1 utilizando el método del citrato de sodio (Arruabarrena et al., 2016) y se utilizó para la amplificación por PCR del locus blanco (*CYC-B*). Para la identificación de mutaciones dirigidas a *CYC-B* en plantas T0, el ADN genómico se utilizó como molde para amplificar por PCR con los cebadores A y B acoplados con el cebador 5'FAM-m13fw, y los productos se analizaron mediante análisis de fragmentos de alta resolución (HRFA), como se describe en Andersson *et al.* (2017) (Figura 3a y Tabla 1) (Boutin-Ganache et al., 2001). El amplicón (580 pb más 19 pb de la cola m13 del cebador *forward*) incluye la región 5'UTR y la primera parte de la secuencia codificante que contiene ambos sitios blanco de los ARN guías (posiciones -56 a + 524 pb). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 100-200 ng de ADN, 1x MyFi Mix (Bioline, Meridian Bioscience, EE. UU.), 0,25 µM de cada cebador y agua de grado PCR hasta un volumen de 20 µL. Las condiciones de ciclado fueron 95 °C durante 3 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C durante 30 s, 57 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s y un paso final de extensión a 72 °C durante 60 s.

Las secuencias genómicas de las mutaciones se determinaron por secuenciación Sanger de los productos de PCR amplificados a partir de ADN genómico de eventos editados confirmados por HRFA, utilizando los cebadores A y B. La secuencia del amplicón se determinó para el mutante LT46-3 en la generación T0 y para las líneas mutantes LT16-1 y LT46-10 en plantas homocigotas de la generación T1.

3.3.5 Selección de plantas libres de T-DNA y análisis de mutaciones no blanco.

Se analizaron las plantas T0 para determinar la presencia/ausencia de T-DNA amplificando tres regiones diferentes de éste: el gen *nptII*, el promotor 35S y el *cassette* de ARN guías, utilizando los cebadores C+D, E+F y G+H, respectivamente (Figura 4a y Tabla 1). También se utilizaron como control de amplificación en todas las muestras los cebadores I-3 Fw+Rev (Tabla 1) que amplifican el locus *I-3* (Solyc07g055640), un gen endógeno del tomate (Barillas et al., 2008). Las condiciones de las PCR fueron las siguientes: 100-200 ng de ADN, 1x Mango Mix (Bioline, Meridian Bioscience, EE. UU.), 0,25 µM de cada cebador y agua de grado PCR hasta un volumen de 20 µL. Las condiciones de ciclado fueron 95 °C durante 3 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C durante 30 s, 59 °C (C+D) o 52 °C (E+F, G+H, I-3 Fw+Rev) durante 30 s y 72 °C durante 30 s y un paso final de extensión a 72 °C durante 60 s.

Para detectar plantas libres de T-DNA, se analizaron individuos de las progenies T1 y T2 amplificando el *cassette* de ARN guías y el control endógeno en una reacción de PCR múltiple utilizando el kit de PCR NucleoType Plant (Macherey-Nagel, Alemania). Las plantas T1 y T2 que no amplificaron para el *cassette* de ARN guías se examinaron posteriormente para detectar el gen *nptII* y el promotor 35S y se consideraron libres de T-DNA (no transgénicas) cuando la PCR fue negativa para las tres regiones diferentes de éste.

Las plantas no transgénicas seleccionadas se analizaron para detectar la presencia de mutaciones no blanco dentro de los genes candidatos predichos por CRISPOR (Solyc01g008780, Solyc02g078750 y Solyc09g083050). Los tres *loci* se amplificaron mediante PCR utilizando los cebadores enumerados en

la Tabla 1. Los productos de la PCR se secuenciaron utilizando el método de Sanger y se compararon con las secuencias *wild type* (WT) de cada locus.

Tabla 1. Cebadores utilizados en el Capítulo 1.

Nombre	Región blanco	Secuencia (5' → 3')	Referencia
A	CYC-B CDS	<u>CACGACGTTGTAAAACGACT</u> ACAAGTTCCACCTCCCTCCA	Arruabarrena et al., 2023
B	CYC-B CDS	TTCAACAATTTCAACTTCAGCTTCT	Arruabarrena et al., 2023
C	nptII CDS	GAGGCTATTCGGCTATGACTGG	Pino et al., 2010
D	nptII CDS	ATCGGGAGCGGCGATACCGTA	Pino et al., 2010
E	35S promoter	AGATTTGCCTTTTCAATTTTCAGAA	Cermak et al., 2017
F	35S promoter	AGTCCCCCGTGTTCTCTCCA	Cermak et al., 2017
G	sgRNAs cassette	CTAGAAGTAGTCAAGGCGGC	Cermak et al., 2017
H	sgRNAs cassette	GTA AACGACGCGCCAGT	Cermak et al., 2017
I-3 Fw	I-3 locus	CAGTCATTATTAACAAATTTTCAGGATCG	Barillas et al., 2008
I-3 Rev	I-3 locus	TCTGAGCAATACGTCTAGCAGC	Barillas et al., 2008
5'FAM-m13Fw	----	CACGACGTTGTAAAACGAC	Boutin-Ganache et al., 2001
Gen1	CYC-B genomic	TTGCGGAGGCATCACTCTAC	Arruabarrena et al., 2023
Gen2	CYC-B genomic	TGCGTACTTTCTCCCGTTCC	Arruabarrena et al., 2023
Cebadores para regiones no blanco (Off-target)			
Solyc09g083050-F		TGCACACCACACAGCACTAT	CRISPOR
Solyc09g083050-R		ATCGTCCGATCGAAAGCGTT	CRISPOR
Solyc01g008780-F		GGTGGTTACTCACGTTATGCC	CRISPOR
Solyc01g008780-R		CCGGGCTCAAGTAACACGTA	CRISPOR
Solyc02g078750.2_F		TGTGGAAACCACCACAGAA	Arruabarrena et al., 2023
Solyc02g078750.2_R		ATGGGGCAGCACTCAATGC	Arruabarrena et al., 2023

3.3.6 Determinación de características de calidad del fruto y contenidos de licopeno y β -caroteno.

3.3.6a Diseño experimental

Para la caracterización de frutos, las plantas se cultivaron en macetas de 10 L en un invernadero de bioseguridad durante el otoño de 2022. El diseño experimental consistió en dos bloques con dos repeticiones para cada genotipo (WT y LT16-*cycb* Δ 7). Cada repetición estuvo compuesta por 10 plantas. Los frutos con estadios de maduración Pintón y Maduro de cada repetición se cosecharon el mismo día y se procesaron inmediatamente.

Para los ensayos de almacenamiento en frío, las plantas se cultivaron en macetas de 10 L en un invernadero de bioseguridad durante el otoño de 2023. El diseño experimental consistió en cuatro bloques con una repetición para cada genotipo (WT y LT16-*cycb* Δ 7). Cada repetición estuvo compuesta por 8 plantas. Los frutos de estadio Pintón se cosecharon de cada repetición el mismo día y se procesaron inmediatamente.

3.3.6b Observación de fenotipos de flores y frutos.

Se observaron flores y frutos de ambos genotipos durante los ciclos de vida de las plantas y se documentaron con una cámara digital.

Para observaciones microscópicas, la fruta de ambos genotipos se cosechó en el estadio de maduración Verde Maduro y mantuvo a 25 °C hasta lograr un color rojo externo uniforme. Se tomaron muestras compuestas de semillas y tejido locular. Cada muestra compuesta consistió en cinco frutos/repetición/genotipo. Las semillas se separaron del tejido locular utilizando un tamiz de uso doméstico y se colocaron 20 µl de la suspensión de tejido locular en un portaobjetos de vidrio que se cubrió con un cubreobjetos. Las imágenes se adquirieron utilizando una cámara Nikon Digital Slight 1000 acoplada a un microscopio óptico Olympus BH-2.

3.3.6c Determinación de caracteres de calidad del fruto.

La fruta se cosechó en dos estadios de maduración: Pintón y Maduro. Se midió el color externo e interno de 10 frutos/repetición/genotipo utilizando un colorímetro CR-400 (Konica Minolta Optics, Inc. Japón). Se tomaron medidas en tres lugares alrededor del plano ecuatorial de la fruta utilizando el espacio de color CIE 1976 $L^*a^*b^*$. Los valores de color se expresaron como el índice de color modificado de Yeatman (IC) $IC = 2000 \times a^*/L^* \times (a^{*2} + b^{*2})^{0.5}$ (Gómez and Camelo, 2002). El jugo de 10 frutos de cada genotipo y estadio de maduración se obtuvo mediante un extractor de jugo eléctrico y se analizó inmediatamente. La acidez se determinó mediante titulación con NaOH 0,1 N. El contenido de sólidos solubles ($^{\circ}$ Brix) se determinó utilizando un refractómetro digital (DBX-55, ATAGO Co., Ltd., Japón). La firmeza de la fruta se determinó utilizando un texturómetro (TA-XT plus, Stable Micro Systems, Londres, Reino Unido). Se utilizaron diez frutos individuales por repetición y la deformación del fruto (mm) se cuantificó utilizando una placa de compresión de 7,5 cm de diámetro aplicando una fuerza de 10 N y una tasa de compresión de 0,5 mm.s⁻¹.

3.3.6d Determinaciones del contenido de licopeno y β -caroteno.

Se recolectaron muestras de tejido de diferentes partes de 10 frutos [Semillas y tejido locular (S+L), Pericarpio (P) y Columela y Placenta (C+Pl)], así como frutos enteros en los estadios de maduración Pintón y Maduro. Las muestras se congelaron y molieron usando nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su posterior análisis.

Se prepararon extractos de carotenoides utilizando 0,2 g de tejido molido congelado y 1,7 mL de hexano:acetona:etanol (50:25:25) con 0,1% p/v de hidroxitolueno butilado. El tejido se homogeneizó utilizando un disruptor de tejido (Bead Genie, SI-B102, Scientific Industries) con 3 esferas metálicas de 2,5 mm durante 30 s. La mezcla se centrifugó durante 3 min a 7500 x g a 4 °C. La fase superior coloreada se filtró (0,22 µm) y se transfirió a viales de vidrio de color ámbar para su análisis por HPLC. Todo el proceso se realizó en hielo y en condiciones de poca luz.

Se utilizó un sistema de cromatografía líquida Shimadzu equipado con una bomba LC-20AT, un muestreador automático SIL-20A8, un termostato de horno de columna CTO-10ASVP, un degasificador DGU-20A5 y un detector de matriz de diodos SPD-M20A. Se inyectó el extracto de carotenoides (10 µL) y los pigmentos se separaron mediante HPLC usando una columna C8 (150 mm·4,6 mm, tamaño de poro 5 µm) (RigelTM) con metanol:acetonitrilo:triethylamina (90:9:1) como eluyente en un ciclo de 5,5 min usando 0,8 mL/min de flujo isocrático y 30 °C en el horno de columna. El licopeno y el β -caroteno se identificaron mediante sus tiempos de retención y espectros de absorción y se

cuantificaron utilizando curvas de calibración para los estándares de licopeno (Extrasynthese) y β -caroteno (Extrasynthese). Los datos se analizaron utilizando el software LabSolutions de Shimadzu.

3.3.6e Desarrollo del color poscosecha de frutos y almacenamiento en frío.

Los frutos cosechados de los genotipos WT (n=11) y LT16-*cycb* Δ 7 (n=24) en el estadio de maduración Pintón se mantuvieron a 25 °C durante seis días con iluminación natural. Los cambios de color externo se documentaron diariamente. El color externo e interno se midió 6 días después de la cosecha (DPC), como se describe en la sección 3.3.6c.

La fruta de ambos genotipos se almacenó a 5 °C y 95 % de humedad relativa durante 13 días. Los síntomas de daño por frío (manchas marrones deprimidas, deshidratación y pudriciones) se registraron después de 13 días de almacenamiento en frío y se expresaron como la proporción promedio de fruta con síntomas (incidencia) (Min et al., 2018). En este experimento se utilizaron cuatro repeticiones de 10 frutos por genotipo.

3.3.6f Detección histoquímica de malondialdehído (MDA) mediante el reactivo de Schiff

Se extirparon discos de epidermis de frutos almacenados a 5 °C y 95% de humedad relativa durante 13 días utilizando un punzón de 7 mm y pinzas. Se sumergieron completamente diez discos por genotipo en Reactivo de Schiff (Sigma) durante 60 min a temperatura ambiente. El lavado posterior se realizó sumergiendo los discos de epidermis en etanol hirviendo 3-4 veces hasta que el etanol permaneció sin color (Chen et al., 2023). Los discos de epidermis se documentaron utilizando una cámara Nikon Digital Slight 1000 acoplada a un microscopio estereoscópico Nikon SMZ800N. Una coloración rosa más intensa indica un mayor contenido de MDA y, por tanto, peroxidación lipídica en el tejido.

3.3.7 Análisis estadístico

Para el análisis de segregación de las mutaciones en la progenie de LT16-1 se aplicó una prueba de Chi-cuadrado para verificar la bondad de ajuste entre los modelos de segregación Mendeliana observados y esperados. Para las variables con distribución normal se realizó un análisis de varianza para establecer diferencias entre el genotipo editado y no editado, utilizando la prueba de Tukey (* $p < 0,1$; ** $p < 0,05$). En el caso de incidencia de daño por frío, se trabajó con modelos lineales generalizados-MLGM, asumiendo una distribución binomial de la variable de respuesta, el genotipo como efecto fijo, los frutos totales como covariable y la función de enlace logit. En las Tablas 3 y 4 los valores representan las medias $\pm$ el error estándar (EE).

3.4 Resultados

3.4.1 Generación de alelos mutantes knockout para CYC-B en líneas elite de tomate con crecimiento indeterminado.

El genoma del tomate contiene tres genes que codifican enzimas con actividad licopeno β -ciclase probada o predicha: *Solyc06g074240* (B, *CYC-B*), *Solyc04g040190* (*CRTL1*, *LYCB-1*) y *Solyc10g079480* (*LYCB-2*) (www.solgenomics.net). *CYC-B* es el único gen que codifica una licopeno β -ciclase que se expresa específicamente en tejidos de flores y frutos que contienen cromoplastos (Pecker et al., 1996; Ronen et al., 2000). Para promover la acumulación de licopeno en el fruto de plantas de tomate que exhiben un crecimiento indeterminado, se utilizó el sistema de edición génica CRISPR-Cas9 para

generar mutantes *knockout* *CYC-B* directamente en el locus *Beta* de genotipos de tomate que portan el alelo *SP wild type* (*Solyc06g074350*).

Los ARN guías (g1 y g2) diseñados fueron seleccionados en función de sus eficiencias predichas, considerando para la selección los que presentaron el mínimo de posibles sitios no blanco y una actividad *in vitro* eficiente (Figura 3a y 3b). Las secuencias de ambos ARN guías fueron utilizadas para generar una construcción en el vector binario pDIRECT22C que contiene un *cassette* para la expresión policistrónica de los dos ARN guías y un *cassette* para la expresión de Cas9 y Csy4. Esta construcción (Cas9-SICYC-B-271-41) fue introducida en dos genotipos de tomate (LT16 y LT46) con hábito de crecimiento indeterminado vía transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, logrando eficiencias de transformación que varían entre 0,13 a 3 % para LT16 y de 0,75 a 3,6 % para LT46.

Se identificaron tres plantas T0 editadas, una de ellas homocigota monoalélica y dos heterocigotas bialélicas para las mutaciones detectadas. En total, se identificaron en estas plantas cinco alelos mutantes diferentes con distintas delecciones dentro del gen *CYC-B*: *cycbΔ229* en LT46-3, los alelos *cycbΔ1* y *cycbΔ2* en LT46-10, y los alelos *cycbΔ4* y *cycbΔ7* en LT16-1 (Figura 3c). Todos estos alelos se caracterizaron al nivel de secuencia, excepto el alelo *cycbΔ1*, ya que no se detectaron plantas homocigotas en las generaciones T1 o T2 utilizando HRFA (Figura 3d). La línea mutante LT46-*cycbΔ229* contenía una delección de 229 pb, que incluía la secuencia completa entre los sitios blanco de los ARN guía1 y ARN guía2. La línea mutante LT46-*cycbΔ2* mostró una única delección de 2 pb dentro del sitio blanco del ARN guía1 y ningún cambio en el sitio blanco del ARN guía2. El mutante LT16-*cycbΔ4* contenía dos delecciones independientes dentro de los sitios blanco de los ARN guía1 (1 pb) y ARN guía2 (3 pb), y el mutante LT16-*cycbΔ7* exhibió una delección de 6 pb en el ARN guía1 y una eliminación de 1 pb en el sitio blanco del ARN guía2 (Figura 3d). Todos los alelos mutantes secuenciados generaron codones de terminación prematuros en las secuencias de aminoácidos predichas, lo que presumiblemente resultó en proteínas no funcionales debido a la pérdida del dominio conservado de β-licopeno ciclasa (Figura 3e).

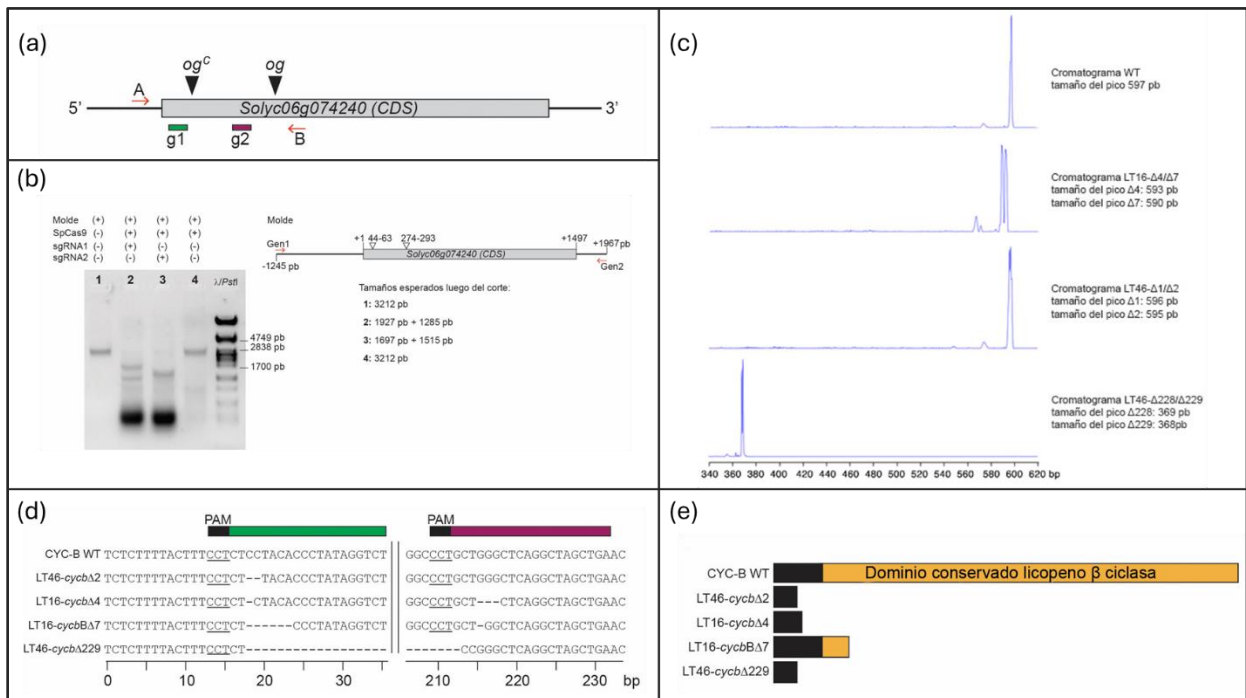


Figura 3. ARN guías, actividad *in vitro* y genotipado de mutaciones obtenidas. (a) Esquema del gen *CYC-B* (*Solyc06g074240*). La posición de los ARN guía1 (g1) y ARN guía2 (g2) se indica con barras verdes y

púrpuras, respectivamente. Las posiciones de las mutaciones *og* y *og^c* se indica con triángulos negros y las flechas rojas indican la posición de los cebadores A y B utilizados para el genotipado (Tabla 1). (b) Ensayo de actividad in vitro de los complejos Cas9-ARN guía1 y Cas9-ARN guía2 utilizando como molde una región genómica de 3212 pb que contiene el gen *CYC-B*. Los cebadores Gen1 y Gen2 (Tabla 1) utilizados para la amplificación por PCR de esta región se indican en el esquema con flechas rojas. Los tamaños esperados luego de la digestión se indican debajo. (c) Análisis de Fragmento de Alta Resolución (HRFA) de los productos de amplificación con los cebadores A y B acoplados al cebador m13 marcado con FAM. Al lado de cada cromatograma se indica el genotipo y los tamaños de cada pico. (d) Posición de los sitios blanco de los ARN guía1 y 2 en la secuencia del genotipo WT y las líneas editadas. (e) Esquema de las proteínas *CYC-B* predichas del genotipo WT y las líneas editadas. En anaranjado se indica el dominio conservado Licopeno β ciclasa.

Se seleccionó la línea editada LT16-1 para profundizar en la caracterización molecular y fenotípica en base a la naturaleza de los alelos mutantes, que presentan algunas ventajas sobre los de las otras líneas. En LT16-1, los tamaños de las delecciones (4 y 7 pb) fueron lo suficientemente pequeños como para que la línea de tomate resultante se considerara no OGM en futuras evaluaciones de bioseguridad; las delecciones estaban presentes en ambos sitios blanco, haciéndolas menos propensas a revertirse; y finalmente, la diferencia de tamaño de 3 pb entre los alelos mutantes presentes en la línea LT16-1 facilitó la detección de homocigotas, así como el análisis de segregación utilizando HRFA.

Para el análisis de segregación de los alelos mutantes, se seleccionaron 61 plantas en la progenie T1 de la línea LT16-1. Dieciséis plantas fueron homocigotas para *cycbΔ4*, 19 para *cycbΔ7* y 26 fueron heterocigotas (Tabla 2). Los números observados se ajustan a la proporción de segregación esperada de 1:2:1 consistente con la herencia mendeliana según la prueba de Chi-cuadrado ($\chi^2 = 1,94$, $p=0,38$).

Tabla 2. Eficiencia de edición en las líneas LT16 y LT46 y segregación de alelos editados y T-DNA en LT16-1.

Genotipo transformado	LT16	LT46
Eficiencia de edición	0,071	0,086

Genotipo	LT16 <i>cycbΔ4</i> / <i>cycbΔ4</i>	LT16 <i>cycbΔ4</i> / <i>cycbΔ7</i>	LT16 <i>cycbΔ7</i> / <i>cycbΔ7</i>
Segregación de los alelos mutantes <i>cycbΔ7</i> and <i>cycbΔ4</i> en la progenie LT16-1 T1 (# de plantas /# de plantas T1 analizadas).	16/61	26/61	19/61
Número de plantas mutantes homocigotas libres de T-DNA (T1 libres de T-DNA /analizadas).	0/16	-/-	1/19
Número de plantas mutantes homocigotas libres de T-DNA (T2 libres de T-DNA /analizadas).	7/49	-/-	5/24

3.4.2 Identificación de plantas libres de T-DNA en las progenies T1 y T2 y análisis de posibles mutaciones en sitios no blanco.

Para identificar líneas mutantes libres de transgenes, se analizó el ADN genómico de los mutantes homocigotos LT16-*cycbΔ7* y LT16-*cycbΔ4*, para detectar la presencia del *cassette* de expresión de los

ARN guía (cebadores G y H). Se utilizó como control interno de amplificación el locus *I-3* endógeno utilizando los cebadores I-3 Forward & Reverse. Para la línea LT16-*cycb*Δ7 se identificó una planta homocigota en la progenie T1 negativa para la amplificación del T-DNA y cinco en la progenie T2. Además, también se identificaron siete plantas homocigotas LT16-*cycb*Δ4 libres de T-DNA en la progenie T2 (Tabla 2). Una de estas líneas, LT16-*cycb*Δ7, se analizó adicionalmente para detectar la presencia del gen *nptII* (cebadores C y D) y el promotor 35S (cebadores E y F) y se seleccionó para futuros experimentos porque no se detectó amplificación para ninguna de las PCR (Figuras 4a y 4b, Tabla 1).

Posteriormente, la línea LT16-*cycb*Δ7 editada sin transgenes se analizó para detectar la presencia de mutaciones en tres posibles sitios no blanco predichos, ubicados en exones de los genes *Solyc01g008780* y *Solyc09g083050* y en un intrón del gen *Solyc02g078750*. Se utilizó ADN genómico para la amplificación por PCR de estas secuencias utilizando los cebadores enumerados en la Tabla 1. La secuenciación de estos amplicones reveló la ausencia de mutaciones en los sitios no blanco analizados para la planta editada LT16-*cycb*Δ7 seleccionada (Figura 4c).

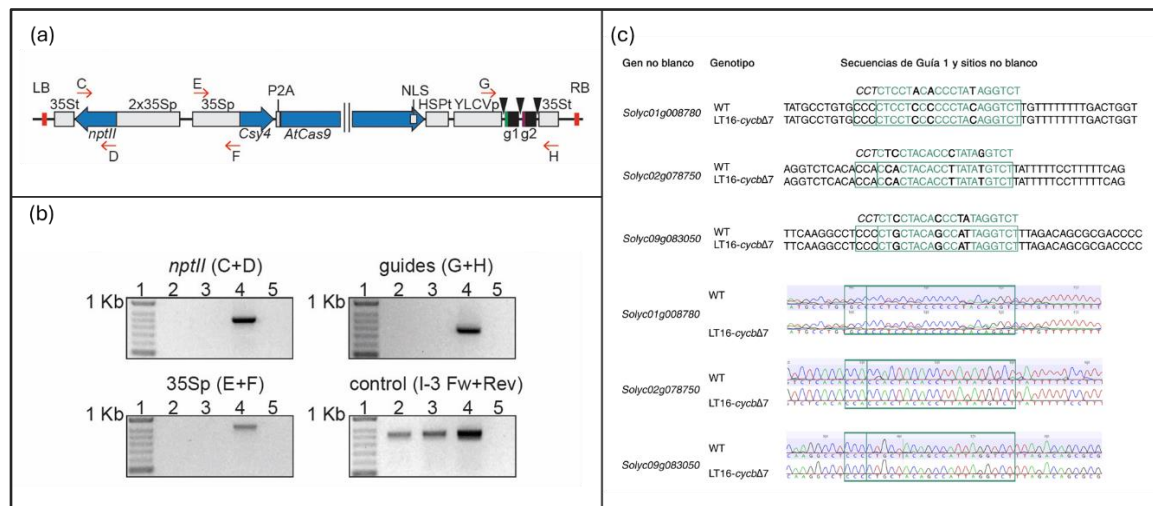


Figura 4. Identificación de plantas libres de T-DNA y caracterización de la secuencia de potenciales sitios no blanco en la línea libre de T-DNA LT16-*cycb*Δ7. (a) Esquema del T-DNA correspondiente a la construcción Cas9-SICYC-B-271-41. Las secuencias codificantes se indican con flechas azules, las regiones reguladoras (promotores y terminadores) con rectángulos grises, los ARN guías con rectángulos negros y verde para el ARN guía1 y púrpura para el ARN guía2, los sitios de corte de *Csy4* se indican con triángulos negros y los bordes derecho e izquierdo, así como los cebadores utilizados se indican con rojo (flechas en el caso de los cebadores). (b) Geles de agarosa para las cuatro regiones amplificadas correspondientes al gen *nptII* (cebadores C+D), *cassette* de ARN guías (*guides*) (G+H), promotor 35Sp (E+F) y gen control endógeno (I-3 Fw+Rev). 1. Marcador de peso molecular Hyperladder 50bp (Meridian), 2. LT16 WT, 3. LT16-*cycb*Δ7, 4. LT16-1 T0 transgénica, 5. Control de reacción sin ADN. (c) Secuencia de ADN correspondiente a los sitios no blanco potenciales predichos para el ARN guía1 de los genes *Solyc01g008780*, *Solyc09g083050* and *Solyc02g078750*. Comparación de la secuencia de LT16 WT con la de LT16-*cycb*Δ7. Las diferencias entre la secuencia del ARN guía1 y el sitio no blanco potencial están resaltadas en color negro y con negrita. Abajo se pueden observar los cromatogramas correspondientes obtenidos por secuenciación Sanger.

3.4.3 Fenotipos de flores y frutos mutantes *LT16-cycbΔ7*.

Para analizar el efecto de la mutación $\Delta 7$ de pérdida de función de CYC-B en el desarrollo de las plantas y la acumulación de licopeno, se cultivaron plantas mutantes *LT16-cycbΔ7* y se compararon sus características fenotípicas con el genotipo parental sin editar (WT) durante todo su ciclo de vida. No se observaron diferencias en la morfología vegetativa y la progresión del desarrollo entre la línea *LT16-cycbΔ7* y el genotipo WT. Sin embargo, al igual que con los mutantes naturales *og* y *og^c*, se observaron claras diferencias fenotípicas en la pigmentación de flores y frutos de *LT16-cycbΔ7*. Las flores del mutante mostraron pétalos y anteras de color anaranjado en contraste con las flores de color amarillo brillante del genotipo WT (Figura 5). Además, la fruta del mutante *LT16-cycbΔ7* mostró un desarrollo de color rojo más temprano en el estadio Pintón, específicamente en la columela, la placenta y el tejido locular que rodea las semillas (Figuras 5 y 6). Esto también fue evidente en el estadio Maduro, donde la columela mostró un color rojo más oscuro y la placenta y el tejido locular eran rojos en lugar de anaranjados (Figura 5).

El índice de color externo e interno (IC) de la fruta también mostró diferencias significativas entre *LT16-cycbΔ7* y el genotipo WT. En el estadio Pintón, el índice de color externo fue 1,92 veces mayor para *LT16-cycbΔ7* que para el genotipo WT (IC 7,32 versus 3,8, respectivamente), mientras que, en el estadio Maduro, el IC fue 1,42 veces mayor en *LT16-cycbΔ7* que el del genotipo WT (IC 29,55 versus 20,85, respectivamente). Asimismo, para el índice de color interno, los valores de *LT16-cycbΔ7* fueron 1.36 veces mayores en el estadio Pintón (IC 21.04 y 15.42 para *LT16-cycbΔ7* y WT, respectivamente) y 1.17 veces mayores en el estadio Maduro (CI 26.38 y 22.5 para *LT16-cycbΔ7* y WT, respectivamente) (Figura 5).

	Flor	Pintón	Maduro
LT16 WT			
	I.C. externo	3.80**	20.85**
	I.C. interno	15.42**	22.50**
	Licopeno (μg/g PF)	15.00**	40.00
	β-caroteno (μg/g PF)	5.40**	6.00**
LT16- <i>cycbΔ7</i>			
	I.C. externo	7.32**	29.55**
	I.C. interno	21.04**	26.38**
	Licopeno (μg/g PF)	26.00**	48.20
	β-caroteno (μg/g PF)	2.90**	2.70**

Figura 5. Caracterización fenotípica de la línea *LT16-cycbΔ7* en comparación con *LT16 WT*. Detalle de Flor y aspecto interno de los frutos en estadios Pintón y Maduro. Debajo de la imagen de cada fruto se indican los valores de Índice de Color (I.C.) externo e interno y contenido de licopeno y β-caroteno expresado en μg/g de peso fresco (PF) para cada genotipo en el estadio correspondiente de

maduración (Pintón y Maduro). Los valores representan las medias. Dos asteriscos indican diferencias significativas entre genotipos para el estadio de maduración correspondiente ($p < 0,05$).

También se observaron diferencias fenotípicas a nivel microscópico en células del tejido locular. Las células intactas de LT16-*cycb*Δ7 presentaron abundantes cromoplastos cristaloides de licopeno en contraste con las células del genotipo WT, que exhibieron principalmente cromoplastos redondos que contenían β-caroteno y pocos cromoplastos cristaloides de licopeno (Figura 6). Además, los cristales de licopeno eran más abundantes y grandes en LT16-*cycb*Δ7 que en el genotipo WT. Por el contrario, el tejido locular del genotipo salvaje presentó predominantemente estructuras anaranjadas pequeñas y redondas y algunos cristales de licopeno más pequeños (Figura 6). El tamaño de los cristales de licopeno observados en LT16-*cycb*Δ7 osciló entre 13 y 39 μm, mientras que el tamaño de los cristales en muestras del genotipo WT osciló entre 4,3 y 11 μm.

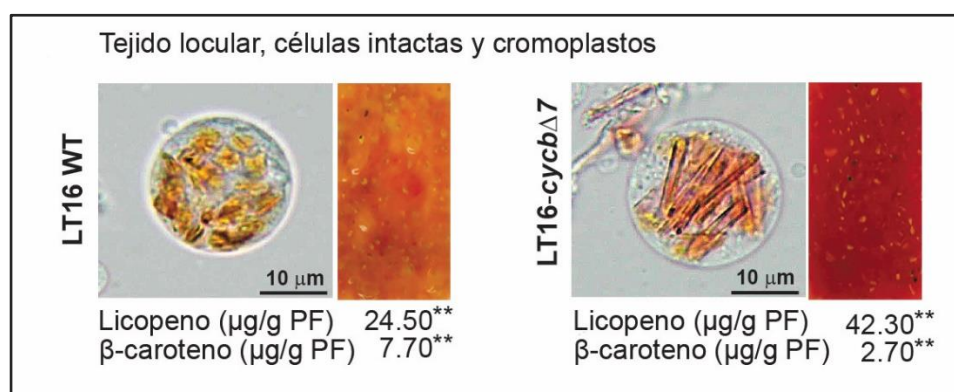


Figura 6. Tejido locular y células individuales representativas donde se evidencian los cromoplastos característicos en cada genotipo (WT y *cycb*Δ7). Abajo de cada imagen se indican los valores del contenido de licopeno y β-caroteno expresado en μg/g de PF. Los valores representan las medias. Dos asteriscos indican diferencias significativas entre genotipos para el estadio de maduración correspondiente ($p < 0,05$).

3.4.4 Calidad del fruto del mutante LT16-*cycb*Δ7 en los estadios de maduración Pintón y Rojo Maduro.

Para determinar si la pérdida de actividad de CYC-B afectó la calidad del fruto en la línea LT16-*cycb*Δ7 editada, se evaluó en diferentes estadios de maduración del genotipo editado y su parental no editado. No se detectaron diferencias en la firmeza, acidez y contenido de sólidos solubles (°Brix) de la fruta de LT16-*cycb*Δ7, en comparación con la del genotipo WT (Tabla 3). Sin embargo, se observaron diferencias significativas en el color y el contenido de licopeno y β-caroteno en la fruta LT16-*cycb*Δ7 en comparación con la fruta del genotipo WT (Figura 5). En el estadio Pintón, el contenido de licopeno LT16-*cycb*Δ7 fue 1,75 veces mayor cuando se muestreó fruta entera (26,3 μg/g PF en LT16-*cycb*Δ7 y 15,0 μg/g PF en WT), 1,66 veces mayor cuando se muestreó tejido de columela y placenta y 1,79 veces mayor en la muestra de semillas y tejido locular (Figura 6, Tabla 4). Sin embargo, en el estadio Maduro, el contenido de licopeno en LT16-*cycb*Δ7 solo fue mayor en la muestra de semilla y tejido locular (1,72 veces) y en la muestra de columela y la placenta (1,3 veces). En contraste, el contenido de β-caroteno fue significativamente menor para todos los tejidos muestreados en ambos estadios de maduración, desde 1,35 veces menor en el pericarpio del fruto Maduro hasta 4,90 veces menor en la columela y placenta del fruto rojo maduro (1,0 μg/g PF en LT16-*cycb*Δ7 y 4,9 μg/g PF en WT) (Tabla 4).

El desarrollo del color poscosecha de los frutos mostró diferencias significativas entre LT16-*cycbΔ7* y el genotipo WT. Cuando se cosecharon en el estadio Pintón, los frutos LT16-*cycbΔ7* presentaron color externo rosado, mientras que los del genotipo WT eran de color verde amarillento con manchas anaranjadas (Figura 7 'Cosecha'). Durante el proceso de maduración poscosecha, el fruto LT16-*cycbΔ7* desarrolló un color rojo externo más uniforme antes que el genotipo WT (Figura 7, 1, y 6 DPC). Después de seis días, el índice de color externo de la fruta LT16-*cycbΔ7* fue 1,35 veces mayor (IC 32,94) que el de la fruta WT (IC 23,64). De manera similar, el índice de color interno en LT16-*cycbΔ7* fue 1,39 veces mayor y se distribuyó de manera más uniforme en las partes internas del fruto (Figura 7 '6 DPC').

Tabla 3. Determinaciones de Calidad de fruta para los estadios Pintón y Maduro de LT16-WT y LT16-*cycbΔ7*.

Estadio de madurez	Pintón		Maduro	
Genotipo	WT	LT16- <i>cycbΔ7</i>	WT	LT16- <i>cycbΔ7</i>
Acidez titulable (%)	0,20 ± 0,00	0,21 ± 0,01	0,21 ± 0,00	0,21 ± 0,01
Contenido de sólidos solubles (°Brix)	3,51 ± 0,11	3,52 ± 0,06	3,48 ± 0,19	3,71 ± 0,12
Firmeza (deformación del fruto, mm)	1,6 ± 0,04	1,4 ± 0,11	2,4 ± 0,37	2,0 ± 0,34

Los valores corresponden a la media ± EE. Se utilizaron 10 frutos por repetición biológica. No se encontraron diferencias significativas para ninguno de las variables determinadas (ANOVA, $p < 0,05$).

Tabla 4. Concentración de Licopeno y β -caroteno en distintos tejidos de frutos en los estadios Pintón y Maduro.

Parte del fruto	Semillas + Tejido locular		Columela + Placenta		Pericarpio (P)		Fruto completo	
Genotipo	WT	LT16- <i>cycbΔ7</i>	WT	LT16- <i>cycbΔ7</i>	WT	LT16- <i>cycbΔ7</i>	WT	LT16- <i>cycbΔ7</i>
Estadio Pintón								
Licopeno	19,3 ± 3,4**	34,5 ± 2,3**	16,6 ± 1,8**	27,6 ± 1,5**	16,9 ± 3,3	24,8 ± 2,8	15,0 ± 1,6**	26,3 ± 1,8**
β -Caroteno	8,7 ± 0,4**	3,2 ± 0,1**	4,5 ± 0,4**	1,4 ± 0,2**	4,6 ± 0,3**	3,4 ± 0,2**	5,4 ± 0,3**	2,9 ± 0,2**
Estadio Maduro								
Licopeno	24,5 ± 4,0**	42,3 ± 4,1**	28,4 ± 2,4*	37,0 ± 3,5*	51,7 ± 7,8	52,9 ± 5,7	40 ± 5,3	48,2 ± 4,6
β -Caroteno	7,7 ± 0,6**	2,7 ± 0,1**	4,9 ± 0,3**	1,0 ± 0,1**	5,6 ± 0,6**	3,2 ± 0,4**	6,0 ± 0,4**	2,7 ± 0,3**

LT16 *wild type* (WT) y línea editada (LT16-*cycbΔ7*). Los valores son la media ± EE y están expresados en $\mu\text{g/g}$ PF. Un asterisco indica diferencias significativas en medias entre WT y LT16-*cycbΔ7* con $p < 0,1$ y dos asteriscos con $p < 0,05$ de acuerdo con la prueba de Tukey.

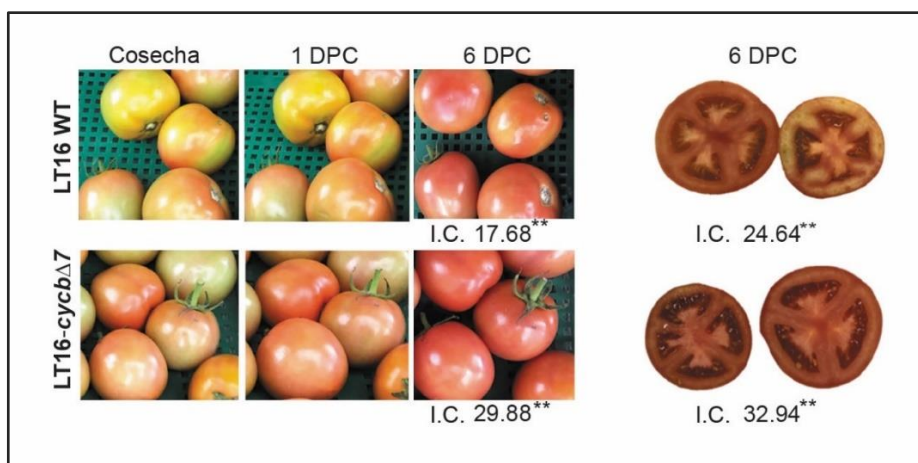


Figura 7. Desarrollo de color poscosecha de frutos cosechados en el estadio Pintón de LT16-WT y LT16-cycbΔ7 almacenados a 25 °C. DPC: días poscosecha, I.C.: índice de color. Los valores representan las medias. Dos asteriscos indican diferencias significativas entre genotipos ($p < 0,05$).

3.4.5 Almacenamiento en frío.

Los frutos de genotipos editados y WT se cosecharon en el estadio Pintón y se almacenaron durante 13 días a 5 °C. Luego de este período, el porcentaje de frutos con síntomas visibles de DPF fue notablemente menor en LT16-cycbΔ7 (20 %), en comparación con el WT (63 %) (Figura 8a). Además, los niveles de peroxidación lipídica inducida por la baja temperatura en la epidermis de la fruta fueron evidentemente más bajos en LT16-cycbΔ7 que en WT (Figura 8b). Estos resultados sugieren que la acumulación temprana de licopeno durante la maduración de la fruta favorece la tolerancia al frío y previene el daño inducido por las bajas temperaturas. Hasta donde sabemos, este es el primer trabajo que establece una asociación directa entre el contenido de licopeno y la tolerancia al frío en el tomate.

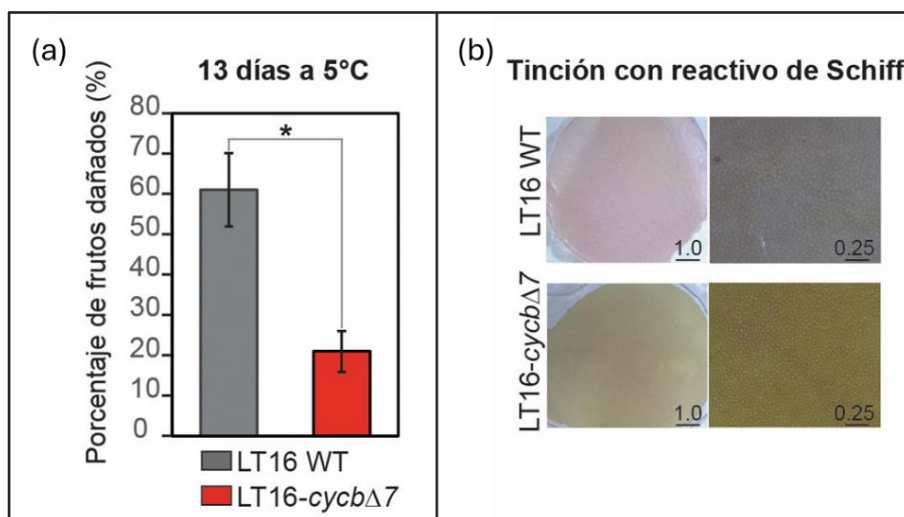


Figura 8. Caracterización del daño por frío en frutos cosechados en el estadio Pintón de LT16-WT y LT16-cycbΔ7. (a) Porcentaje de frutos con síntomas de daño por frío luego de 13 días de almacenamiento a 5 °C. Los valores representan las medias $\pm$ EE. Un asterisco indica diferencias significativas entre genotipos ($p < 0,05$). (b) Detección histoquímica de malondialdehído por tinción con reactivo de Schiff de discos de epidermis de frutos almacenados a 5 °C por 19 días.

3.5 Discusión y conclusiones

En el transcurso de las últimas décadas, se han identificado varios mutantes de tomate que exhiben una mayor acumulación de licopeno en frutas (Wann et al., 1985; Peters et al., 1989; Van Tuinen et al., 1997). Se han aislado y caracterizado los genes subyacentes a estas mutaciones, incluidos *CYC-B* para las mutaciones *og* y *og^c* (Ronen et al., 2000; Hwang et al., 2016; Mohan et al., 2016), *DET1* para el mutante *high pigment 2 (hp2)* (Mustilli et al., 1999) y *DDB1* para el mutante *high pigment 1 (hp1)* (Lieberman et al., 2004; Liu et al., 2004). *DDB1* (UV-Damaged DNA Binding protein1) y *DET1* (Deetiolated1) son dos proteínas que interactúan y desempeñan un papel en la fotomorfogénesis y tienen una influencia indirecta en la acumulación de carotenoides y el color de la fruta (Peters et al., 1989; Mustilli et al., 1999; Schroeder et al., 2002; Hunziker et al., 2020). Debido a la función reguladora de los genes *DET1* y *DDB1*, además del mayor contenido de carotenoides, los mutantes *hp* presentan alteraciones en diversas señales del desarrollo, incluyendo el desarrollo del fruto, la maduración y las respuestas a la luz (Cookson et al., 2003; Liu et al., 2004; Levin et al., 2006). Por el contrario, *CYC-B* es un gen estructural en la ruta de síntesis de los carotenoides, y el aumento de licopeno observado en los mutantes *og* y *og^c* resulta de una interferencia directa con el catabolismo de este pigmento en las frutas, sin afectar otros procesos fisiológicos de la planta (Ronen et al., 2000).

En este capítulo, utilizamos CRISPR-Cas9 para interrumpir el gen *CYC-B* en dos genotipos elite de tomate (LT16 y LT46) que albergan alelos *SP wild type*, creando germoplasma novedoso con una combinación genética original que puede incorporarse fácilmente a programas de mejoramiento. Las líneas *knockout* de *cyc-b* editadas resultantes presentaron hábito de crecimiento indeterminado y un mayor contenido de licopeno en la fruta, superando el estrecho ligamiento genético en fase de repulsión que existía entre estos dos importantes caracteres.

Para interrumpir el gen *CYC-B*, se diseñaron y expresaron dos ARN guías (g1 y g2) dirigidos a la secuencia codificante del gen *CYC-B* en las posiciones 41 y 271 pb del codón ATG (Figuras 3a y d). Obtuvimos cinco alelos *knockout* diferentes para *CYC-B*, que contienen pequeñas deleciones (1, 2, 4 o 7 pb) o una delección mayor (229 pb). Todos los alelos editados obtenidos codifican para proteínas *CYC-B* truncas no funcionales (Figura 3d). Las frecuencias de edición obtenidas en este trabajo (0,071 para el genotipo LT16 y 0,086 para LT46, Tabla 2) fueron similares a las reportadas para otros genotipos de tomate, oscilando entre 0,03 y 0,83 para Micro-Tom, 0 a 0,95 para Alicia Craig y 0,72 promedio para M82) (Čermák et al., 2015; Pan et al., 2016; Yu et al., 2017; Li et al., 2018). Además, obtuvimos líneas editadas homocigotas sin T-DNA en las dos primeras generaciones posteriores a la transformación de la planta que fueron utilizadas para el fenotipado (Figura 4 y Tabla 2).

La caracterización fenotípica de las líneas de tomate editadas demostró que la interrupción de *CYC-B* afecta el color de las flores y los frutos, así como los niveles de licopeno y β -caroteno en frutos mientras que otros caracteres de calidad no cambian en comparación con el genotipo no editado (acidez, contenido de sólidos solubles, y firmeza fueron similares al genotipo parental no editado) (Figura 5, Tablas 3 y 4). Tampoco se observaron, al igual que ocurre con los mutantes *og* y *og^c*, alteraciones en el desarrollo de la planta en las líneas editadas en comparación con el genotipo WT.

El licopeno representa el 90% del total de carotenoides en frutos de tomate rojo maduros, seguido del β -caroteno (7%), la luteína (2%) y el fitoeno y fitoflueno (1%) (Ronen et al., 2000). En general, para la fruta madura, los mutantes *og^c* tienen contenidos mayores de licopeno y menores de β -caroteno que los genotipos salvajes (Ronen et al., 2000; Ilahy et al., 2018). Sin embargo, se ha reportado en algunos trabajos un aumento en los niveles de β -caroteno además del licopeno para algunos genotipos con alelos *CYC-B* no funcionales (Silletti et al., 2013; Ilahy et al., 2018; Hunziker et al., 2022). En este trabajo,

el contenido de β -caroteno fue menor en la línea mutante (LT16-*cycb* Δ 7) tanto para el estadio Pintón como Maduro, en todas las partes analizadas del fruto (Tabla 4). Por el contrario, el contenido de licopeno fue significativamente mayor en LT16-*cycb* Δ 7 exclusivamente en el estadio Pintón, en comparación con el genotipo WT. Curiosamente, en el estadio Maduro, las partes del fruto 'semillas+tejido locular' ($p < 0,05$) y 'columella+placenta' ($p < 0,1$) de la línea mutante presentaron niveles más altos de licopeno en comparación con el genotipo WT, pero no fue el caso en el pericarpio. Esto sugiere que otras enzimas con actividad licopeno ciclasa distintas de *CYC-B* pueden estar actuando en esta parte del fruto evitando una mayor acumulación de licopeno en el pericarpio de las líneas *cyc-b knockout* y también podrían explicar los niveles presentes de β -caroteno en estas frutas. Los genes que codifican proteínas con tal actividad incluyen *LCYB-1* o *CrtL-b* (*Solyc04g040190*), que codifica una enzima licopeno β -ciclasa de localización cloroplástica que se expresa en tejidos verdes y flores y cuyos niveles de ARNm disminuyen durante la maduración de la fruta (Ronen et al., 2000) (http://bar.utoronto.ca/eplant_tomato/). De acuerdo con la información disponible en el sitio "Tomato Expression Atlas" (<https://tea.solgenomics.net/>), durante el proceso de desarrollo y maduración del fruto del cultivar M82, existe una expresión diferencial de los genes *CYC-B* y *LCYB-1* en distintas partes del fruto: el gen *CYC-B* se expresa más en la columela, la placenta y el tejido locular, mientras que *LCYB-1* tiene una mayor expresión en el pericarpio en el estadio Pintón y en etapas posteriores de maduración del fruto (Figura 9) (Fernandez-Pozo et al., 2017). Otro ejemplo es *LCYB-2* (*Solyc10g079480*), que codifica una proteína que contiene dominios asociados con la actividad β -ciclasa y se acumula predominantemente en hojas y flores (<https://solgenomics.net/>, http://bar.utoronto.ca/eplant_tomato/). Finalmente, *LCY- ϵ* o *CrtL-e* (*Solyc12g08980*) codifica para la enzima licopeno ϵ ciclasa, una proteína que se localiza tanto en cloroplastos como en cromoplastos y que, al igual que *CYC-B*, su expresión se regula negativamente durante la maduración del fruto (http://bar.utoronto.ca/eplant_tomato/) (Ronen et al., 1999; Giorio et al., 2013; Shinozaki et al., 2018).

celular y consecuente desarrollo de los síntomas. El licopeno es un poderoso antioxidante y se ha reportado que su función protectora durante el estrés por frío en la cáscara de pomelo (específicamente en el flavedo, la parte coloreada) está asociada con mayor capacidad de eliminar las ROS (Lado et al., 2015b; Lado et al., 2016a). En este trabajo demostramos que la línea de tomate LT16-*cycb*Δ7 editada, que acumula niveles más altos de licopeno, es más tolerante al daño por frío que el genotipo WT durante el almacenamiento en frío poscosecha (Figura 8). Estos resultados sugieren que la acumulación temprana de licopeno durante la maduración en frutas editadas podría ayudar a mitigar el desarrollo de síntomas de daño por frío en los tomates. Este es el primer reporte que establece una asociación clara entre el contenido de licopeno y la tolerancia al frío en el fruto del tomate.

El incremento del contenido de licopeno en la fruta de plantas editadas también mejoró el índice de color en los estadios Pintón y Maduro, tanto para la coloración externa como interna (Figura 5). Los cambios de color y perfil de carotenoides también se relacionaron con grandes diferencias en las estructuras de los cromoplastos del tejido locular de ambos genotipos. La línea LT16-*cycb*Δ7 editada mostró cristales de licopeno más grandes y abundantes que el genotipo salvaje, donde predominaron las estructuras de acumulación de β-caroteno, y los cristales de licopeno eran escasos y más pequeños (Figura 6). La mayoría de los autores han descrito cromoplastos cristaloides de licopeno en células del mesocarpio de tomates maduros (Rosso, 1968; Nguyen et al., 2001; Jeffery et al., 2012; Schweiggert et al., 2012; Torres-Montilla and Rodriguez-Concepcion, 2021). El β-caroteno también se acumula en estructuras cristaloides, así como en estructuras similares a plastoglobulos (Nguyen et al., 2001; Maass et al., 2009; Schweiggert et al., 2011; Schweiggert et al., 2012). En los tomates, estas estructuras son menos comunes en las células del pericarpio del fruto. Sin embargo, las estructuras de cromoplastos que acumulan carotenoides en el tejido locular que rodea las semillas de tomate no se han descrito previamente. En el presente estudio, encontramos que el tejido locular del genotipo WT almacena principalmente β-caroteno en estructuras similares a plastoglobulos de forma redonda, y los cromoplastos cristaloides de licopeno son más pequeños y menos abundantes que en la línea editada LT16-*cycb*Δ7, donde los cromoplastos cristaloides de licopeno son las estructuras predominantes.

Adicionalmente, la edición de *CYC-B* resultó en fruta con un color rojo más uniforme que el del genotipo WT durante la maduración poscosecha del fruto a 25 °C (Figura 7). Este desarrollo homogéneo de color durante la maduración poscosecha representa una ventaja comercial adicional para la cadena de comercialización de tomate de consumo en fresco, donde la cosecha se realiza en el estadio Pintón y los frutos maduran en tránsito o durante el almacenamiento previo a su comercialización.

En este trabajo se demostró que CRISPR-Cas9 es una herramienta útil y poderosa para romper ligamientos genéticos no deseados de caracteres de interés en el mejoramiento genético de tomate. Esta herramienta fue utilizada para mutagenizar genes estrechamente ligados en maíz, arroz, *Setaria viridis* y álamo (Doll et al., 2019; Hu et al., 2020; Weiss et al., 2020; Chen et al., 2022). En arroz, además, se utilizó para romper el ligamiento genético entre los genes *OsC1* y *OsS5n* que están estrechamente ligados genéticamente en el cromosoma 6 (Sanfeng et al., 2020).

En el tomate, *CYC-B* y otros genes, como *DET1* y *DDB1*, han sido blanco para la edición génica utilizando CRISPR-Cas, imitando mutaciones naturales de genotipos con alto contenido de licopeno (Li et al., 2018; Hunziker et al., 2020; Lakshmi Jayaraj et al., 2021; Yang et al., 2022). En el tomate silvestre *S. pimpinellifolium*, se logró la edición simultánea de los genes *SP* y *CYC-B* para generar un hábito de crecimiento determinado y frutos con alto contenido de licopeno (Zsögön et al., 2018). Sin embargo, el sistema CRISPR-Cas9 no se había utilizado en tomate cultivado para superar el ligamiento genético

entre la mutación *sp* y el locus *CYC-B*. Usando esta herramienta, imitamos las mutaciones *og* y *og^c* que surgieron naturalmente en genotipos de crecimiento determinado (mutantes *sp*), modificando un solo gen y sin afectar otros caracteres de las líneas elite de mejoramiento de tomate indeterminadas (*SP/SP*), logrando combinar ambas características por primera vez. En conclusión, el aumento del contenido de licopeno del fruto obtenido directamente en genotipos elite de tomate que tienen hábito de crecimiento indeterminado proporciona la base para la producción de híbridos y la comercialización final del producto. Este trabajo proporciona, a su vez, evidencia del rol protector del licopeno durante el almacenamiento en frío de la fruta, reduciendo los síntomas de daño por frío y generando tomates para consumo en fresco con un valor comercial potencialmente mayor que el genotipo silvestre.

4. CAPÍTULO 2: Caracterización de alelos y genes que codifican la enzima Fitoeno Sintasa (PSY) en tomate (cultivado y silvestre).

4.1 Introducción

La Fitoeno Sintasa (PSY) es la primera enzima en la ruta de biosíntesis de carotenoides y juega un rol clave en el control del flujo metabólico de la ruta. Los niveles de acumulación de esta enzima dependen de una serie de mecanismos de regulación que actúan a distintos niveles (Zhou et al., 2022). Las PSY de plantas suelen ser proteínas muy inestables, con una alta tasa de reciclado y suelen requerir de proteínas chaperonas para estabilizarse y mantener su actividad carotenogénica en los plastidios (Zhou et al., 2022). El primer gen clonado e identificado para una PSY de plantas fue el gen que codifica la PSY1 de tomate (*Solyc03g031860*), responsable de la acumulación masiva de licopeno durante la maduración del fruto al aumentar su expresión génica durante este proceso (Bartley et al., 1992). En general, las angiospermas tienen dos o más copias de genes parálogos que codifican para PSYs, con algunas excepciones que tienen un único gen, como ocurre en algunas especies del género *Arabidopsis*, *Cairica papaya* y *Beta vulgaris*, entre otras (Lisboa et al., 2022; Zhou et al., 2022). El hecho de tener más de una copia de genes codificantes para PSYs ha permitido que éstos se diversifiquen, por ejemplo, en muchos casos los diferentes genes parálogos se expresan en diferentes órganos, tejidos, estadios de desarrollo o responden a diferentes estímulos (Zhou et al., 2022). Las PSY pertenecen a la superfamilia Clase 1 de enzimas biosintéticas de isoprenoides y comparten un dominio conservado de prenilttransferasa con las esqualeno sintasas (squalene/phytoene synthase - Pfam no. 00494) (Lisboa et al., 2022; Zhou et al., 2022). Suelen tener entre 300 y 450 aminoácidos y no poseen dominios transmembrana (Lisboa et al., 2022). El sitio activo de estas enzimas tiene cinco motivos altamente conservados: bolsillo de unión al sustrato, residuos catalíticos, residuos activos de la tapa, dos regiones ricas en aspartato y un sitio de unión al sustrato Mg^{2+} . Estos residuos del sitio activo son idénticos y están conservados aun en los genes ortólogos de hongos y bacterias (Han et al., 2015; Zhou et al., 2022).

En tomate, se han identificado 3 genes que codifican para PSYs: *PSY1*, que se expresa exclusivamente en tejidos que contienen cromoplastos, *PSY2* (*Solyc02g081330*), que se expresa en tejidos fotosintéticos y *PSY3* (*Solyc01g005940*), que se expresa en raíces en interacciones con micorrizas arbusculares y está involucrada en la producción de Strigolactonas y otros apocarotenoides (Bartley et al., 1992; Bartley and Scolniks, 1993; Fray and Grierson, 1993; Giorio et al., 2008; Stauder et al., 2018). El gen que codifica para *PSY3* es el más antiguo, ya que surgió antes de la diversificación de las angiospermas y gimnospermas mientras que los genes que codifican a *PSY1* y *PSY2* son parálogos, que surgieron de la triplicación del genoma de las solanáceas y luego se diversificaron adquiriendo funciones y patrones de expresión diferenciales (Giorio et al., 2008; Sato et al., 2012; Lisboa et al., 2022). En el tomate, esta diversificación, además de patrones de expresión diferenciales, también resultó en diferencias en sus propiedades bioquímicas y su actividad enzimática, siendo *PSY2* más eficiente en la producción de fitoeno que *PSY1* (Fraser et al., 2000; Cao et al., 2019). Esta menor eficiencia de la *PSY1* se compensa con una alta inducción de su expresión génica durante la maduración del fruto, la cual es varias veces mayor que la expresión máxima de *PSY2* (Giorio et al., 2008). Adicionalmente, se ha estudiado la expresión del gen que codifica para *PSY1* en tomate cultivado y sus homólogos en varias especies de tomate silvestre de fruta amarilla o verde. Se observó que los niveles de expresión génica en frutos de tomate cultivado (*S. lycopersicum*) en los estadios Verde Maduro y

Maduro son mayores (más de 60 veces) que en especies emparentadas de fruto verde (como *S. habrochaites* y *S. penelli*) y fruto amarillo (más de 45 veces en *S. cheesmaniae*). Estas diferencias podrían ser la consecuencia de cambios a nivel de las regiones reguladoras de estos genes que se observan en las diferentes especies (Efremov et al., 2020). Asimismo, se ha observado que el tomate silvestre *S. pimpinellifolium*, que es el único que posee frutos rojos, acumula mayor contenido de licopeno que el tomate cultivado (Ashrafi et al., 2012; Foolad, 2013; Kinkade and Foolad, 2013).

En este capítulo, se estudiaron el tomate cultivado (*S. lycopersicum*) y el tomate silvestre *S. pimpinellifolium*. Se decidió trabajar con estas especies ya que *S. pimpinellifolium* es el único tomate silvestre que presenta frutos rojos y se observa en sus frutos una mayor acumulación de licopeno. En primer lugar, se compararon los niveles de expresión génica de los genes que codifican para PSY1 en varios estadios de maduración del fruto y en otros órganos como hojas y pétalos. Además, se identificó el gen *Solyc08g007440*, que está anotado en Solgenomics (www.solgenomics.net) como una posible Fitoeno Sintasa ya que pertenece a la Superfamilia de Enzimas de Biosíntesis de Isoprenoides Clase 1, posee el dominio pfam n°00494 y el dominio Interpro IPR002060 Esqualeno/Fitoeno sintasa. Comparamos su expresión génica en tomate cultivado y *S. pimpinellifolium* y realizamos una caracterización funcional y bioinformática de este gen para determinar si la proteína codificada posee actividad Fitoeno Sintasa. Finalmente, se diseñaron marcadores moleculares para asistir en la introgresión del gen *PSY1* de *S. pimpinellifolium* en el tomate cultivado.

4.2 Objetivos específicos

- I. Determinar los patrones de expresión génica de *PSYs* en fruto, pétalos y hoja de tomate cultivado y *S. pimpinellifolium* LA 1589.
- II. Diseñar y validar marcadores moleculares para la introgresión en el tomate cultivado del gen de *S. pimpinellifolium* que codifica para *PSY1*.
- III. Determinar si el gen *Solyc08g007440* presenta actividad fitoeno sintasa.

4.3 Metodología

4.3.1 Material Vegetal, diseño experimental y condiciones de cultivo

Se utilizaron plantas de *Solanum lycopersicum* cultivar M82 y plantas de *S. pimpinellifolium* LA1589 para todos los ensayos.

Para cada genotipo se plantaron 4 macetas con 4 plantas cada una y se utilizó cada maceta como una repetición biológica. Se cosecharon frutos de cada maceta y se separaron de acuerdo con el estadio de madurez: Verde, Pintón y Maduro.

4.3.2 Extracción de ARN, retrotranscripción y determinación de la expresión génica por qPCR.

Para la extracción de ARN total de frutos se utilizó la metodología descrita previamente en Alquézar (2007) con algunas modificaciones. Se utilizaron 2 tubos de 2 mL con tejido molido en nitrógeno líquido (hasta la medida de 0,5 mL) para cada muestra. Se agregaron 770 µL de Buffer de Extracción (200mM Tris-HCl pH 8, 400 mM NaCl, 50mM EDTA pH 8, 2% Sarkosyl, 1% PVP-40, 1% β-mercaptoetanol) y 380 µL de fenol para ARN (Applichem) a cada tubo, se vortexeó y se incubó durante 15 min a 65 °C. A

continuación, se agregaron 380 µL de CHISAM 24:1, se vortexeó y se centrifugó a 4000 x g a temperatura ambiente durante 10 min. Se transfirió a fase soluble a un nuevo tubo y se volvió a extraer con Fenol/CHISAM 380 µL de cada uno, vortex y centrifugación por 10 min a 4000 x g a temperatura ambiente. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y se agregaron 1,5 volúmenes de etanol 100%, se mezcló invirtiendo el tubo 5-6 veces y se centrifugó a 20000 x g por 30 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 300 µL de agua libre de RNAsas. Se juntaron las dos repeticiones en un único tubo (600 µL) y se agregó 1/3 del volumen de cloruro de litio (LiCl) 12 M. Se incubó en hielo a 4 °C hasta el día siguiente. Se centrifugó a máxima velocidad durante 30 min a 4 °C. A continuación, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol 80% centrifugando durante 5 min a máxima velocidad a 4 °C. Se secó el pellet a temperatura ambiente y luego se resuspendió en 30 µL de agua libre de RNAsas. El ARN se cuantificó utilizando un Nanodrop (Thermo Scientific) y se verificó su integridad mediante electroforesis en gel de Agarosa 1%.

Para la síntesis de ADN copia se trataron 2 µg de ARN con DNAsal (New England Biolabs, USA) utilizando oligoDT cebadores (QIAGEN, Hilden, Germany) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN copia obtenido se diluyó 4 veces y se utilizaron 2 µL para las reacciones de qPCR.

Las reacciones de qPCR se llevaron adelante en el equipo StepOne Plus™ (Applied Biosystems) utilizando el kit SensiFAST™SYBR® Hi-ROX Kit (Bioline Reagents Ltd., United Kingdom) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los niveles de expresión de ARNm se determinaron utilizando el método del $2^{\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001) utilizando el gen de *Actina* (*Solyc03g078400.2*) como gen “housekeeping” (Mascia et al., 2010). Se utilizaron tres repeticiones biológicas para cada muestra. Los cebadores utilizados se detallan en la Tabla 5.

Se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) para determinar diferencias significativas en los niveles de expresión génica utilizando la prueba LSD Fisher. Letras diferentes indican diferencias significativas con valores $p < 0,05$.

Tabla 5. Lista de cebadores utilizados en el capítulo 2. Los sitios de corte de enzimas de restricción se encuentran subrayados.

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Loci	Referencia
SlqPSY1-F	GTTGATGGCCCAAACGCATC	<i>Solyc03g031860</i>	este trabajo
SlqPSY1-R	AAGCACCATCGAGCATGTCA		
SlqPSY2-F	CTGGGCAATATATGTGTGGTGC	<i>Solyc02g081330.4</i>	este trabajo
SlqPSY2-R	TATCTCCAGCCTTGCTCC		
SlqPSY4-F2	CTGTGCTTTGCCTGCTGTG	<i>Solyc08g007440.1</i>	este trabajo
SlqPSY4-R2	GGGGAGCCCCTAAGATTCT		
SlqAct-F	AGGCAGGATTTGCTGGTGATGATGCT	<i>Solyc03g078400</i>	Mascia et al., 2010
SlqAct-R	ATACGCATCCTTCTGTCCATTCCGA		
PSY1-BHI fwd	GGTTTTCTTGGGATCCATGTCTGTTGCC	<i>Solyc03g031860</i>	este trabajo
PSY1-HIIIrev	CTTCATTTAAGCTTTTATCTTTGAAGAGAGGC		
PSY4-BHI fwd	CACTTTTGGATCCATGAATGGTGCTTCTTCG	<i>Solyc08g007440.1</i>	este trabajo
PSY4-SIrev	GAAAAAGGAGCTCTCAATATTTGCCCTCCATG		
CAPS PSY1f	CTCTACCCTCCCCAGATCC	<i>Solyc03g031860</i>	este trabajo
CAPS PSY1r	GGAGTCATTAGCATAGTTCC		

4.3.3 Análisis bioinformático de PSYs

Las secuencias genómicas, codificantes y aminoácidas correspondientes a *PSY1* (Solyc03g031860), *PSY2* (Solyc02g081330), *PSY3* (Solyc01g005940) y *Solyc08g007440* de tomate cultivado (*S. lycopersicum*) y tomate silvestre (*S. pimpinellifolium*) se obtuvieron de Solgenomics (www.solgenomics.net). Los alineamientos de las secuencias aminoácidas se realizaron mediante Clustal W Multiple Alignment utilizando el software Bioedit Sequence Alignment Editor (<https://thalljscience.github.io/>) (Hall, 1999). Para la identificación de dominios conservados se utilizó la herramienta “Conserved Domain Search” de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). El análisis de elementos en *cis* de las regiones 5'UTR y 2000 pb aguas arriba se realizó utilizando la herramienta New PLACE (<https://thalljscience.github.io/>) (Higo et al., 1999).

4.3.4 Complementación heteróloga en *Escherichia coli*

4.3.4a Clonado en vector de expresión bacteriano y transformación de *E. coli DS1B-ΔcrtB*

Las secuencias codificantes de *S. pimpinellifolium* LA1589 para *PSY1* (Solyc03g031860) y *Solyc08g007440* fueron amplificadas por PCR utilizando la enzima de alta fidelidad Phusion (Thermo Scientific) y los cebadores PSY1-BHI fwd y PSY1-HIII rev que incorporan los sitios de restricción *Bam*HI y *Hind*III para *PSY1* y los cebadores PSY4-BHI fwd y PSY4-SIrev que incorporan los sitios de restricción *Bam*HI y *Sac*I para *Solyc08g007440* (Tabla 5). En el caso de *PSY1* se utilizó como molde ADN copia preparado a partir de ARN extraído de fruto en el estadio Pintón mientras que para *Solyc08g007440* se utilizó ADN genómico ya que este gen no posee intrones. Los productos de amplificación y el vector pET28a para expresión en bacterias fueron digeridos con ambas enzimas de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación, se corrieron en un gel de Agarosa 1%, se cortaron y purificaron las bandas correspondientes a los productos digeridos y se realizó la ligación utilizando la enzima T4 DNA Ligasa (Thermo Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizó el screening por PCR de colonias y se seleccionaron 3 colonias positivas; se realizaron minipreps que fueron digeridas con las enzimas *Hind*III y *Bam*HI para *PSY1* y con las enzimas *Bam*HI y *Sac*I para *Solyc08g007440*. Los productos de la digestión se visualizaron mediante electroforesis en gel de Agarosa 1% y se enviaron a secuenciar. Luego de comprobadas las secuencias se transformaron ambas construcciones, por separado, en la cepa de *E. coli DS1B-ΔcrtB*, que carece de actividad fitoeno sintasa. Se seleccionaron colonias positivas por PCR para los ensayos de complementación.

4.3.4b Ensayos de complementación bacteriana

Se utilizaron las cepas de *E. coli* detalladas en la Tabla 6. El ensayo de complementación se realizó por triplicado, en cada repetición se utilizaron colonias diferentes.

Se realizaron precultivos partiendo de colonias aisladas en 5 mL de medio LB con los antibióticos correspondientes para cada cepa (Tabla 6) y se incubaron a 37 °C con agitación por 16 h. Se utilizaron 2 mL de estos precultivos para inocular 50 mL de medio LB con los antibióticos correspondientes a cada cepa. Cuando los cultivos llegaron a una OD₆₀₀ entre 0,5 y 0,8 se indujo la transcripción utilizando IPTG a una concentración final de 1 mM y los cultivos se incubaron durante 48 h a 30 °C con agitación en oscuridad. Finalmente, los cultivos se centrifugaron y se observó y documentó fotográficamente la coloración de los pellets de bacterias.

Tabla 6. Cepas bacterianas utilizadas para ensayos de complementación de actividad fitoeno sintasa.

Cepa	Resistencia
<i>E. coli</i> XL1Blue	--
<i>E. coli</i> BL21-Gold DS1B	Cloranfenicol
<i>E. coli</i> BL21-Gold DS1B- Δ crtB	Cloranfenicol
<i>E. coli</i> BL21-Gold DS1B- Δ crtB-pET28a	Cloranfenicol + kanamicina
<i>E. coli</i> BL21-Gold DS1B- Δ crtB-PSY1	Cloranfenicol + kanamicina
<i>E. coli</i> BL21-Gold DS1B- Δ crtB-Solyc08g007440	Cloranfenicol + kanamicina

4.3.5 Diseño de marcadores moleculares para introgresión de PSY1 de *S. pimpinellifolium* LA1589

Se compararon las variantes entre las secuencias de *S. pimpinellifolium* LA1589 y *S. lycopersicum* cv. M82 utilizando la herramienta "Tomato 360 Variants" disponible en Solgenomics (www.solgenomics.net) (Lin et al., 2014). Se seleccionaron variantes de SNP dentro de la región codificante que generen sitios de restricción. Se diseñaron los cebadores CAPS PSY1f y CAPS PSY1r que amplifican un fragmento de 959 pb que contiene el sitio de restricción *Bgl*II presente en el exón 1 del gen que codifica para PSY1 en genoma de M82. La restricción del producto de amplificación con la enzima *Bgl*II genera 2 fragmentos de 696 y 263 pb en M82 y no digiere el fragmento proveniente de *S. pimpinellifolium* LA1589.

Para ajustar y validar los marcadores diseñados se realizó el cruzamiento de los genotipos *S. lycopersicum* cv. M82 -utilizado como madre- y *S. pimpinellifolium* LA1589 -utilizado como padre-. Se sembraron las semillas obtenidas y se analizaron 32 plantas de la progenie F1, así como 7 plantas de *S. pimpinellifolium* LA1589 y 2 plantas de *S. lycopersicum* cv. M82.

Para el genotipado se utilizó el kit de PCR NucleoType Plant (Macherey-Nagel, Alemania). Las condiciones de las PCR fueron las siguientes: 1x Nucleotype HotStart PCR Master Mix, 0,2 μ M de cada cebador y agua de grado PCR hasta un volumen de 10 μ L. En el invernadero, se utilizó 1 "Plant Transfer Tool (PTT)" para cada planta, se perforó una hoja y se sumergió el PTT en el mix de PCR por 2 s. Las condiciones de ciclado fueron 95 °C durante 3 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C durante 30 s, 52 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s y un paso final de extensión a 72 °C durante 60 s. Se verificó la correcta amplificación corriendo 2 μ L del producto de amplificación. Se digirieron 6 μ L del producto de amplificación con la enzima *Bgl*II (Thermo Scientific) a 37 °C durante dos h de acuerdo con las indicaciones del fabricante y se corrió el producto de la digestión en un gel de agarosa 1% a 100 mA durante 30-45 min.

4.4 Resultados

4.4.1 Expresión diferencial de genes homólogos que codifican para PSY1, PSY2 y el gen Solyc08g007440 en tomate cultivado (*S. lycopersicum* cv. M82) y tomate silvestre (*S. pimpinellifolium* LA1589)

Los niveles de expresión génica de la enzima PSY1 suelen tener una relación directa con el contenido de carotenoides que se acumulan en el fruto. En este trabajo comparamos la expresión génica de PSY1 del tomate cultivado (*S. lycopersicum* cv. M82) y el tomate silvestre *S. pimpinellifolium* LA1589 durante

diferentes estadios de maduración del fruto, en hoja y en pétalos. Se observó que los niveles de expresión de *PSY1* en ambas especies se encuentran altamente inducidos en pétalos y en el fruto, especialmente en el estadio Pintón y en el fruto Maduro (Figura 10). Adicionalmente, la expresión de *PSY1* en el fruto de *S. pimpinellifolium* es aproximadamente 1000 veces mayor que en el tomate cultivado para el mismo estadio de madurez (Pintón y Maduro) al tiempo que es menor en los pétalos, donde en el tomate cultivado los niveles de expresión se asemejan a los del fruto en ambos estadios (Pintón y Maduro). Para el gen *PSY2*, se observa que en el tomate cultivado el órgano con un mayor nivel de expresión son los pétalos, mientras que en *S. pimpinellifolium*, los pétalos y las hojas son los órganos donde se observa mayor expresión y en todos los estadios del fruto analizados la expresión de este gen es menor para ambas especies (Figura 10). En el caso de *Solyc08g007440*, podemos observar un aumento de la expresión de este gen en el fruto de *S. pimpinellifolium* LA1589 en el estadio Pintón pero que éste no es tan marcado como para *PSY1* (Figura 10). Cabe destacar que las secuencias aminoacídicas de los tres genes no presentan diferencias entre *S. lycopersicum* cv. M82 y *S. pimpinellifolium* LA1589.

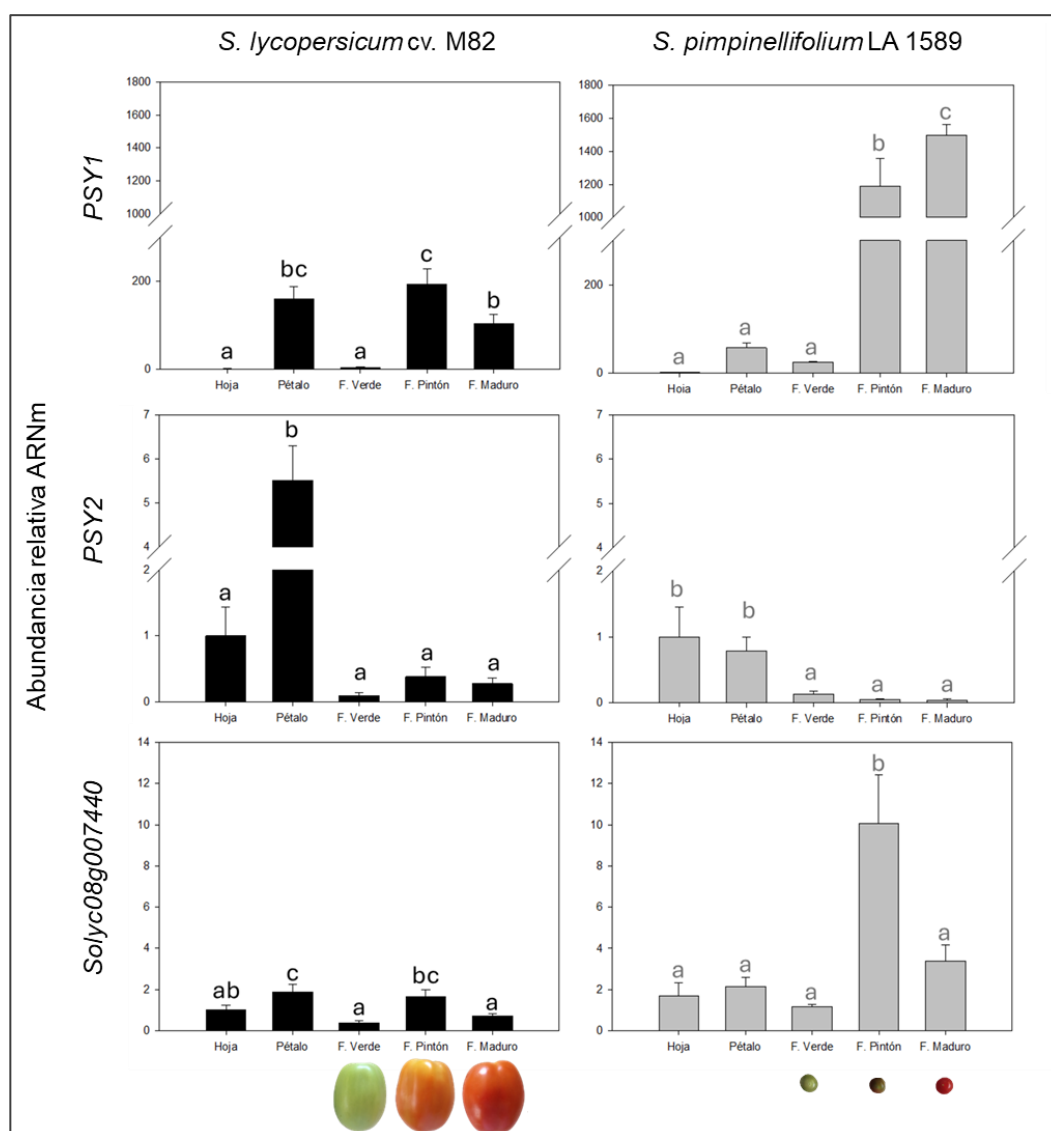


Figura 10. Expresión génica de los genes *PSY1* (*Solyc03g031860*), *PSY2* (*Solyc02g081330*) y *Solyc08g007440* en Hoja, Pétalos y los estadios de maduración del fruto Verde, Pintón y Maduro para *S. lycopersicum* cv. M82 y *S. pimpinellifolium* LA 1589. Los cálculos de la expresión relativa se realizaron

con el método del $2^{\Delta\Delta CT}$ con relación al valor en Hoja de M82. Los valores graficados representan la media $\pm$ el EE. Letras diferentes indican diferencias significativas entre estadios, dentro de cada genotipo ($p > 0,05$). Debajo de las gráficas se muestran frutos representativos (a escala) para cada estadio de maduración de cada genotipo.

Debido a las diferencias tan notorias observadas en los niveles de expresión de *PSY1* entre ambas especies, se analizó la secuencia correspondiente a la región 5'UTR (381 pb) y 2000 pb adicionales aguas arriba de ambos genotipos en búsqueda de la presencia y abundancia de elementos regulatorios diferenciales (Figura 11a y Tabla 7). En la Figura 11a podemos observar que en la posición -208pb encontramos una inserción de una T en *S. pimpinellifolium*; en la posición -1582pb encontramos una inserción en *S. lycopersicum* de 2 repetidos AAAAT (en total 10 pb) y finalmente, en la posición -2087/-2077 se observa un SNP donde hay una G en la secuencia de *S. pimpinellifolium* y una C en la de *S. lycopersicum*. Debido a la presencia de estos polimorfismos, se generan algunos elementos reguladores en *cis* diferenciales entre los promotores de ambos genes, identificados mediante análisis *in silico*. En la Tabla 7 se muestran los diferentes motivos encontrados y las características de éstos. El SNP detectado en las posiciones -2087/-2077 no generó elementos regulatorios diferentes entre las secuencias. Por otro lado, la inserción de los dos repetidos AAAAT en *S. lycopersicum* generó algunos elementos extra en esta especie. Sin embargo, estos elementos generados no están asociados con una regulación clara de la expresión génica (Tabla 7). Finalmente, la inserción de una T en la posición -209 de la secuencia de *S. pimpinellifolium* generó 3 elementos regulatorios adicionales en esta especie, dos de ellos no están relacionados con la expresión o regulación de genes involucrados con el metabolismo del fruto (uno de estos elementos es específico del mesófilo de plantas C4 y el otro se relaciona con la regulación génica en el polen), mientras que el tercer elemento adicional (SORLIP5AT) estaría involucrado en la regulación por luz y se asocia a la regulación vía PHYA, la cual se ha relacionado con la regulación de la biosíntesis de carotenoides (Tabla 7). Estas diferencias en la secuencia de los promotores no parecen ser suficientes para explicar las diferencias entre los patrones de expresión génica observados experimentalmente para estos genes en los dos genotipos de tomate. Es posible entonces que otros factores distintos a los elementos presentes en los promotores, participen de la regulación de la expresión de estos genes.

Los patrones de expresión génica de *Solyc08g007440*, con un aumento durante la maduración del fruto, y la anotación de éste en Solgenomics (como PSY4) sugieren que podría tratarse de una fitoeno sintasa aún no descrita, por lo que se realizó un análisis bioinformático de su secuencia aminoacídica en comparación con las otras PSY de tomate y con la PSY de *A. thaliana*. También se realizó su caracterización biológica para determinar si posee actividad fitoeno sintasa *in vivo*. En el análisis bioinformático, la búsqueda de dominios conservados reveló que *Solyc08g007440* únicamente presenta el dominio conservado pfam n°00494, mientras que las otras PSY poseen, además, el dominio PLN02632, específico de fitoeno sintasas. Al alinear y analizar su secuencia aminoacídica con las PSY de tomate 1, 2 y 3 y con la PSY de *A. thaliana*, no se detectó en ésta la presencia de los sitios conservados relacionados a la actividad fitoeno sintasa, como las dos regiones ricas en aspartato, los dos sitios de unión al sustrato-Mg²⁺, los residuos catalíticos, los residuos que componen la tapa del sitio activo y los residuos que pertenecen al bolsillo de unión al sustrato (substrate binding pocket) (Figura 11b).

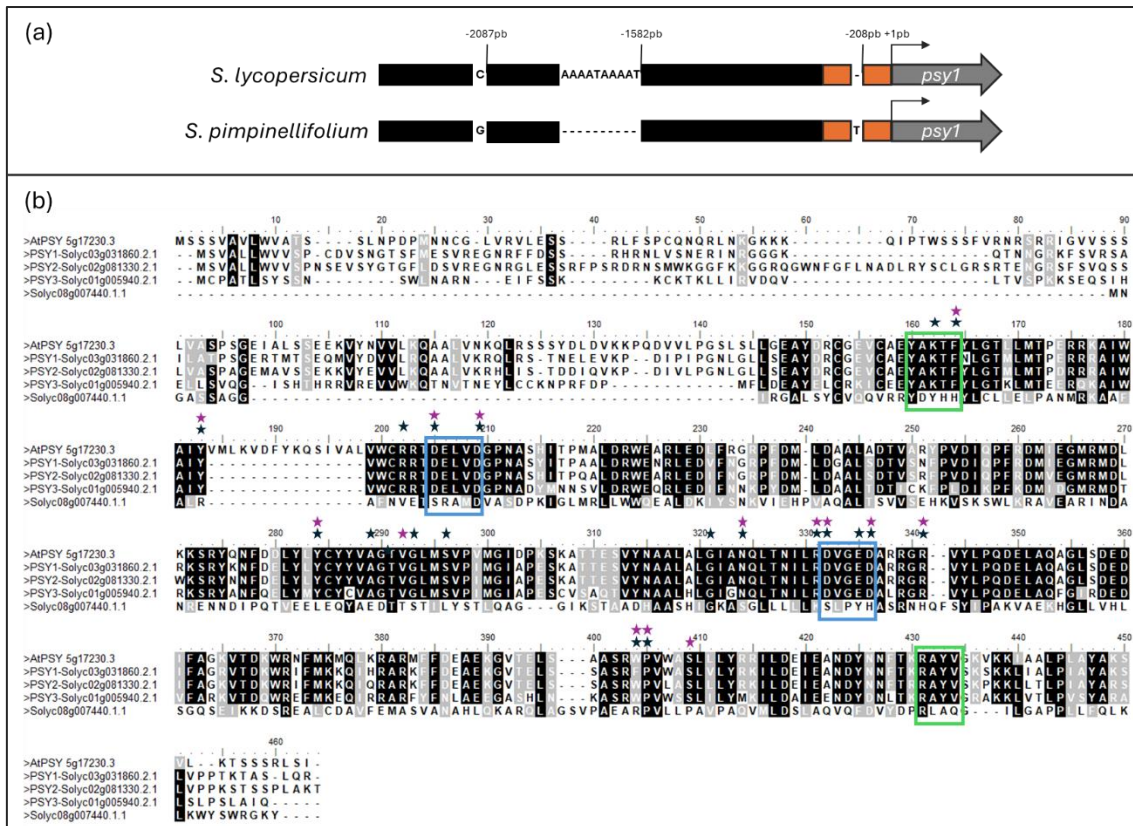


Figura 11. Análisis bioinformáticos. (A) Esquema de las regiones promotoras de *PSY1* de *S. lycopersicum* y *S. pimpinellifolium*. (B) Alineamiento de secuencias aminoacídicas de la PSY de *A. thaliana*, las PSY1, 2 y 3 de tomate y *Solyc08g007440.1.1*. Los dominios conservados se encuentran en recuadros verdes (Sitio de unión al sustrato Mg²⁺ y región rica en Aspartato) y celestes (residuos de la tapa del sitio activo). Los aminoácidos del bolsillo de unión al sustrato se indican con una estrella azul y los residuos catalíticos con estrellas púrpuras.

Tabla 7. Elementos en *cis* diferenciales entre las regiones promotoras de *PSY1* en *S. lycopersicum* y *S. pimpinellifolium* encontrados utilizando la herramienta New PLACE (<https://thalljscience.github.io/>).

Tipo	Secuencia	<i>S. lycopersicum</i> cv. Heinz		<i>S. pimpinellifolium</i> LA1589		Comentarios
		Hebra	Posición	Hebra	Posición	
MARTBOX	TTWTWTTWTT	-	-1601	n/d	n/d	Motivo relacionado con el anclaje del scaffold (Gasser et al., 1989)
		-	-1596	n/d	n/d	
POLASIG1	AATAAA	+	-1601	n/d	n/d	Elemento relacionado con la poliadenilación (Loke et al., 2005)
		+	-1596	n/d	n/d	
TATABOX5	TTATTT	-	-1597	n/d	n/d	Elemento descrito en el promotor de la glutamina sintetasa regulada por luz (Tjaden et al., 1995)
		-	-1592	n/d	n/d	
SORLIP5AT	GAGTGAG	n/d	n/d	+	-213	Elemento presente en promotores de genes regulados por PhyA (Hudson and Quail, 2003)
CACTFTPPCA1	YACT	n/d	n/d	-	-212	Elemento regulatorio de la expresión de genes específicos del mesófilo en plantas C4 (Gowik et al., 2004)
GTGANTG10	GTGA	n/d	n/d	+	-211	Motivo relacionado con la regulación del gen g10, del polen de tabaco (Rogers et al., 2001)

n/d: no determinado, Y: C o T, W: A o T.

4.4.2 Caracterización funcional de Solyc08g007440 en un sistema bacteriano de complementación heteróloga

Con el fin de determinar si *Solyc08g007440* tiene actividad fitoenosintasa, utilizamos el sistema de complementación heteróloga de las cepas carotenogénicas de *E. coli* BL21-Gold DS1B o DS1B- $\Delta crtB$ que poseen el plásmido pDS1B o pDS1B- $\Delta crtB$, respectivamente. Cuando la cepa DS1B- $\Delta crtB$ fue complementada con el ADN copia del gen que codifica para *PSY1* se reestableció la producción de β -caroteno, que se evidencia por la coloración amarillo claro del pellet bacteriano obtenido. Sin embargo, al ser complementada con el ADN copia del gen *Solyc08g007440*, el pellet bacteriano obtenido permanece blanco, al igual que la cepa DS1B- $\Delta crtB$ sin complementar y la misma cepa complementada con el vector de clonado pET28a vacío (Figura 12). Este resultado indica que este gen no codifica para una proteína con actividad fitoenosintasa, lo que concuerda con el análisis bioinformático de la secuencia aminoacídica (Figura 11b).

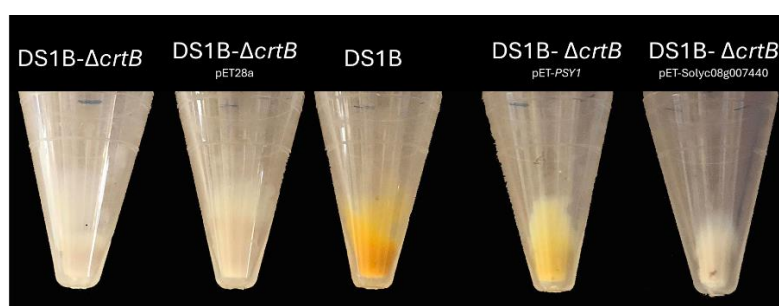


Figura 12. Complementación heteróloga de las regiones codificantes de *PSY1* y *Solyc08g007440* en *E. coli* DS1B- $\Delta crtB$. Los pellets corresponden a 10 mL de cultivo líquido para cada cepa. Pellets con color indican la producción de β -caroteno. Pellets blancos indican la ausencia de carotenoides.

4.4.3 Diseño de marcadores moleculares para la introgresión del alelo de *PSY1* de *S. pimpinellifolium* LA1589

Utilizando los datos disponibles en www.solgenomics.net de Tomato 360 Variants (Lin et al., 2014), se compararon las secuencias del gen *Solyc03g031860* que codifica para *PSY1* en *S. lycopersicum* cv M82 y en *S. pimpinellifolium* LA1589. Se identificaron dos polimorfismos del tipo SNP, uno en el exón 1 y otro en el exón 6. El SNP presente en el exón 1 es un cambio sinónimo, ambos codones codifican el aminoácido Serina (TCT en *S. lycopersicum* y TCA en *S. pimpinellifolium*), mientras que el cambio en el exón 6 tiene como resultado la sustitución de una Valina (GTC en *S. lycopersicum*) por una Isoleucina (ATC en *S. pimpinellifolium*), ambos aminoácidos no polares. A su vez, la variante en el exón 1 modifica el sitio de restricción *Bgl*II (presente en *S. lycopersicum* y ausente en *S. pimpinellifolium*). En base a esta modificación, se diseñaron cebadores para amplificar un fragmento de 959pb que abarca el exón 1 y una porción de la región 5'UTR y el intrón 1 (Tabla 5, Figura 13a). El fragmento obtenido, al ser incubado con la enzima de restricción *Bgl*II, es digerido en dos productos de 697 y 262pb cuando está presente el alelo proveniente de *S. lycopersicum*, mientras que esto no ocurre si el alelo es el de *S. pimpinellifolium* LA1589. En el caso de un genotipo heterocigota se observarán 3 fragmentos de 959, 697 y 262 pb.

Se genotiparon 2 plantas de *S. lycopersicum* cv. M82, 7 de *S. pimpinellifolium* LA1589 y 32 plantas de la progenie F1. Los marcadores diseñados lograron discriminar los dos alelos previstos, sin embargo, de las 7 plantas analizadas de *S. pimpinellifolium* LA 1589, solamente una resultó homocigota para el alelo correspondiente; el resto de las plantas analizadas presentaron el alelo correspondiente a *S.*

lycopersicum cv. M82, al igual que las dos plantas analizadas para este genotipo (Figura 13b). En la progenie F1, contrariamente a lo esperado (toda la F1 heterocigota), se detectó 1 planta heterocigota mientras que el resto de las plantas fueron homocigotas para el alelo correspondiente a M82 (Figura 13b). Las plantas genotipadas de *S. pimpinellifolium* LA 1589 y *S. lycopersicum* cv. M82 provienen de semillas de las plantas utilizadas para realizar los cruzamientos, por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que el polen colectado de *S. pimpinellifolium* LA 1589 para realizar los cruzamientos provenía de plantas que presentaban el alelo de M82 además del alelo proveniente de LA 1589 que se identificó en Tomato 360 Variants. En consecuencia, no se procedió con el proceso de validación.

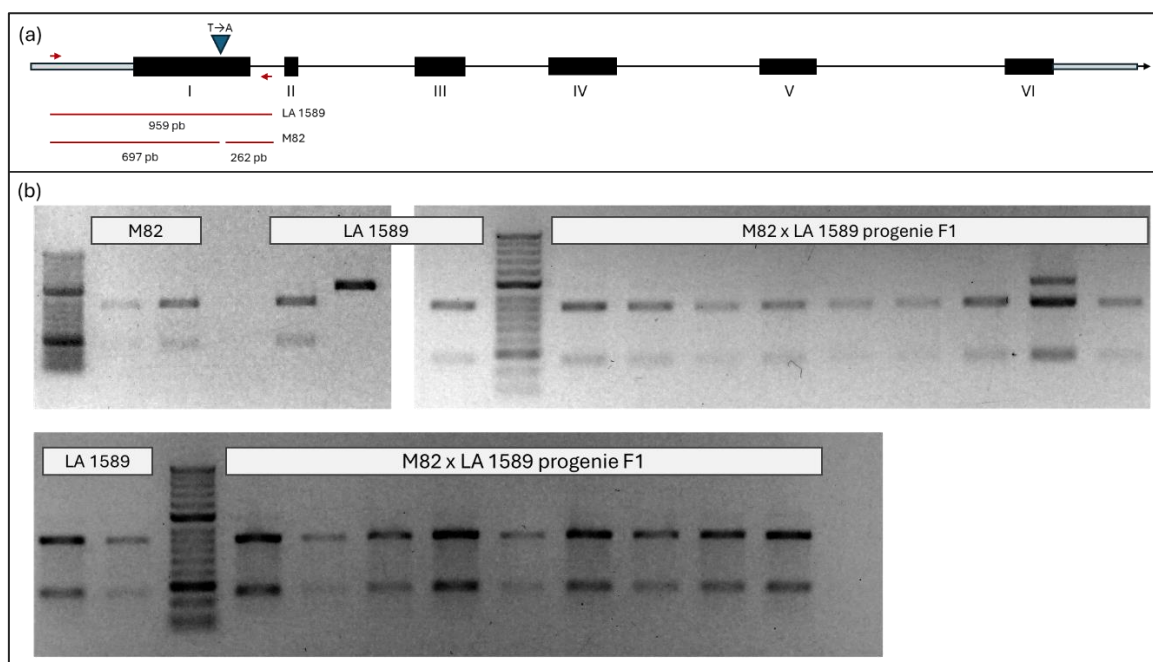


Figura 13. Estrategia de diseño y genotipado para discriminar alelos de *PSY1* presentes en *S. lycopersicum* cv. M82 y *S. pimpinellifolium* LA 1589. (a) Esquema del gen *PSY1*, los exones se encuentran representados con rectángulos negros, los intrones con una línea negra y las regiones 5' y 3' UTR con rectángulos grises. El triángulo azul sobre el exón I indica la posición del SNP que tiene una T en M82 y una A en LA 1589. La posición de los cebadores CAPS *PSY1f* y *PSY1r* se indica con flechas rojas. Debajo se indica con líneas rojas los tamaños esperados de los productos de PCR luego de la digestión con *Bgl*III para ambos genotipos. (b) Genotipado de *S. lycopersicum* cv. M82, *S. pimpinellifolium* LA 1589 e individuos de la progenie F1 derivada del cruzamiento de ambos genotipos. Las imágenes corresponden a electroforesis en gel de agarosa 1%. El marcador de peso molecular es Hyperladder 50bp donde las bandas más intensas corresponden a 2000, 1000 y 300 pb.

4.5 Discusión y conclusiones

La introgresión de alelos de interés provenientes de especies emparentadas con el tomate cultivado es ampliamente utilizada en el mejoramiento genético, sobre todo cuando se trata de genes relacionados con la resistencia o tolerancia a enfermedades (Foolad and Sharma, 2005; Barillas et al., 2008; Verlaan et al., 2013). Esta estrategia podría también utilizarse para otros caracteres como, en este caso, incrementar el contenido de licopeno del fruto del tomate cultivado. Dentro de las especies silvestres emparentadas con *S. lycopersicum*, *S. pimpinellifolium* es el único que posee frutos rojos y se ha reportado que sus frutos poseen mayor contenido de licopeno y un color rojo más intenso (Ashrafi et al., 2012; Foolad, 2013; Kinkade and Foolad, 2013). La fitoeno sintasa es la principal enzima reguladora del flujo de la ruta de síntesis de carotenoides y su mayor actividad promueve la síntesis y

acumulación de carotenoides (Giorio et al., 2008; Cao et al., 2019). En este capítulo, se compararon los patrones de expresión génica de *PSY1*, *PSY2* y *Solyc08g007440* durante la maduración del fruto, así como en pétalos y hojas, se analizaron y compararon sus secuencias a nivel aminoacídico y también la región promotora del gen que codifica para *PSY1* (*Solyc03g031860*). Se realizó la caracterización funcional del gen *Solyc08g007440* en un sistema de complementación heteróloga bacteriano y finalmente se diseñaron marcadores moleculares para la introgresión del alelo para *PSY1* proveniente de *S. pimpinellifolium* LA 1589.

Los altos niveles observados en la expresión génica de *PSY1* durante la maduración del fruto concuerdan con trabajos previos, en donde se describen niveles de expresión mayores de este gen con relación a *PSY2* en tejidos no fotosintéticos como pétalos y frutos en estadio Pintón y Maduro en tomate cultivado (Giorio et al., 2008). En este trabajo, los niveles de expresión de *PSY1* del tomate cultivado (cv. M82) en pétalos y frutos Pintón y Maduro fueron entre 150 y 200 veces mayores que en tejidos verdes (hoja en expansión y fruto Verde Maduro), siendo el máximo nivel de expresión en fruto Pintón (Figura 10). En cuanto a los niveles de expresión de *PSY2*, el máximo se encontró en pétalos (4 veces más que en hoja en expansión) (Figura 10), que concuerda con los trabajos previos para tomate cultivado (cv. Red Setter) (Giorio et al., 2008). Los mayores niveles de expresión génica de *PSY1* con relación a *PSY2* pueden explicarse por la menor eficiencia de la primera en su actividad fitoenosintasa, y, por ende, una mayor expresión génica se traduce en mayores niveles de enzima para compensar su reducida actividad (Cao et al., 2019). Asimismo, cuando se observa la expresión de *PSY1* en la especie silvestre *S. pimpinellifolium* LA1589, los niveles más altos de transcritos se observan en el fruto en estadios Pintón y Maduro, con valores más de mil veces mayores a los encontrados en tejidos verdes (Figura 10). Recientemente, se ha descrito la expresión de *PSY1* en tomate cultivado y varias especies emparentadas durante la maduración del fruto (Efremov et al., 2020); los autores observaron que los niveles de expresión de *PSY1* se correlacionan con el contenido de carotenoides del fruto y fueron mayores en el tomate cultivado, seguido de *S. cheesmaniae* (de fruto amarillo). En las especies de fruto verde (*S. habrochaites* y *S. pennellii*), los niveles de expresión en este órgano son muy bajos, siendo los pétalos el tejido con mayor expresión de *PSY1* (Efremov et al., 2020).

No existen datos de la expresión génica de *PSY1* en *S. pimpinellifolium*; los resultados de este trabajo sugieren que podría presentar una regulación diferente a la del tomate cultivado, debido a que presenta niveles de expresión muy elevados durante la maduración del fruto. La comparación de la región 5'UTR más 2000 pb aguas arriba de *S. lycopersicum* y *S. pimpinellifolium* detectó pequeñas diferencias; una de éstas es la inserción de una tiamina (T) en la región 5'UTR (-208pb) de *S. pimpinellifolium*, la que genera un sitio GAGTGAG denominado SORLIP5AT (Higo et al., 1999; Hudson and Quail, 2003) (Figura 11a, Tabla 7). Este elemento en *cis* se encuentra en promotores de genes que son regulados por el fitocromo PHYA, relacionado con la regulación de la biosíntesis de carotenoides, específicamente de *PSY1*, durante la maduración del fruto en tomate (Hudson and Quail, 2003; Quian-Ulloa and Stange, 2021). Esto, sumado a otros mecanismos de regulación que restan dilucidar podrían explicar la mayor acumulación de licopeno en esta especie en comparación con el tomate cultivado. La generación de herramientas que permitan introgresar este alelo en el tomate cultivado permitiría facilitar el incremento de licopeno en el fruto de tomate cultivado de forma más eficiente una vez que estos marcadores estén validados con el fenotipo en la progenie.

El gen *Solyc08g007440* presentó un patrón de expresión que sugiere una posible función durante la maduración del fruto en *S. pimpinellifolium*, observándose un incremento de su expresión en el estadio Pintón que no se detectó en el tomate cultivado, donde permanece sin cambios marcados en sus niveles de expresión en los tejidos analizados (Figura 10). Sin embargo, el análisis de su secuencia de

aminoácidos y el ensayo de complementación heteróloga en bacterias descarta que esta proteína funcione como una fitoeno sintasa, ya que no comparte los residuos conservados en otras PSY y no se observó actividad fitoeno sintasa en el sistema de complementación heteróloga en bacterias (Figuras 11b y 12).

En conclusión, en este trabajo se detectaron diferencias importantes en la expresión génica de *PSY1* entre las especies de tomate cultivado y silvestre (*S. pimpinellifolium* LA 1589) y en base a este resultado se diseñaron marcadores moleculares para la introgresión en el tomate cultivado del alelo presente en *S. pimpinellifolium* LA 1589. Sin embargo, no fue posible validar esta herramienta ya que los cruzamientos se realizaron con material de *S. pimpinellifolium* LA 1589 que no era homocigota.

5. CAPÍTULO 3: Caracterización de la biosíntesis de carotenoides en híbridos nacionales de mandarinas y generación de alelos defectuosos de la enzima β LCY2 específica del fruto.

5.1 Introducción

Los cítricos que se cultivan en la actualidad pertenecen al género *Citrus* de la familia de las Rutáceas. Su centro de origen es el sureste de las cuevas del Himalaya, que incluye el oeste de la provincia de Yunnan (China), el este de Assam (India) y el norte de Myanmar (Wu et al., 2018). La mayoría de las especies modernas provienen de la hibridación entre poblaciones (en inglés “*genetic admixture*”) de toronja (*Citrus máxima*) y mandarinas ancestrales (*C. reticulata* tipo 1). Esta hibridación dio origen a las mandarinas de tipo 2 (*C. reticulata* tipo 2), que contienen cierta proporción de los haplotipos P1 y P2 de la toronja. En una etapa posterior, una nueva introgresión de otros haplotipos de toronja originó el grupo de las mandarinas de tipo 3 (*C. reticulata* tipo 3) y el naranjo dulce (*C. sinensis*) donde, posteriores hibridaciones dirigidas entre naranjo dulce y mandarinas (tipo 3) dieron origen a algunas mandarinas modernas de tipo 3 adicionales que suelen denominarse tangores. Otras especies modernas, son híbridos F1 de dos especies, como es el caso de los pomelos (*C. paradisi*), que son el resultado de la hibridación de toronja con naranjo dulce, o el caso del limón (*C. limon*), que es el híbrido resultante del cruzamiento entre el cidro (*C. medica*) y el naranjo agrio (*C. x aurantium*) (Wu et al., 2018). Las relaciones entre las especies ancestrales y las modernas se resumen en la Figura 14.

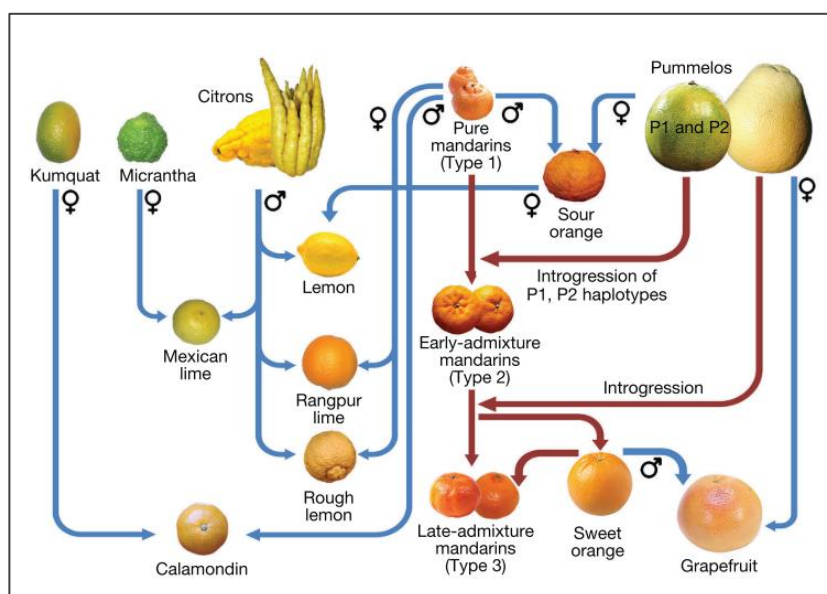


Figura 14. Genealogía de los principales genotipos de cítricos. Las especies ancestrales se ubican en la parte superior del esquema. Las flechas azules indican cruzamientos sencillos entre dos parentales. Las flechas rojas indican procesos más complejos que involucran múltiples individuos, generaciones o retrocruzas. Citron (cidro); Pummelos (toronjas); Kumquat (quinoto); Sour Orange (naranjo amargo); Lemon (limón), Mexican lime (lima mejicana), Rangpur lime (lima rangpur); Rough lemon (limón rugoso); Sweet Orange (naranjo dulce); Grapefruit (pomelo); Mandarin (mandarina). Figura tomada de Wu et al., 2018.

Las mandarinas son frutos que se consumen habitualmente en la dieta occidental y son una importante fuente de vitamina C y carotenoides (Abouzari et al., 2016). Además, su practicidad al momento de consumirlas frente a otros cítricos las convierte en una opción preferida para el consumo en fresco. Esto las vuelve buenas candidatas para mejorar su estética, sus valores nutricionales y su conservación poscosecha, promoviendo así el mayor consumo de frutas. Una estrategia válida para lograr estos objetivos es promover la acumulación de compuestos bioactivos que, además de beneficios a la salud humana, aporten color y potencien la conservación poscosecha, por ejemplo, debido a su capacidad antioxidante. En este sentido, promover la acumulación de licopeno podría ser una buena estrategia. Por ejemplo, en el pomelo rosado Star Ruby, la acumulación de licopeno en la piel se ha relacionado con una mayor tolerancia al daño inducido por frío en la poscosecha, lo que se traduce en una mejor conservación (Lado et al., 2015b; Lado et al., 2016a). La acumulación de licopeno en cítricos es un fenómeno relativamente común en ciertas especies de este género como el pomelo y la toronja y, en menor medida, en naranjas y limones (Xu et al., 2006; Liu et al., 2007; Alquezar et al., 2008; Deng and Xu, 2011; Nishimura et al., 2012; Abouzari et al., 2016). Sin embargo, no existen reportes de mandarinas que acumulen licopeno (Deng and Xu, 2011). Obtener variedades de mandarina que acumulen este compuesto en su pulpa generaría un producto novedoso y atractivo, aportando diversidad en la oferta de frutas y agregando valor en la cadena de consumo.

En los mutantes de cítricos que acumulan licopeno, se desconocen aún las bases moleculares del fenotipo observado. Por ejemplo, se observa una menor expresión génica del gen que codifica la enzima licopeno beta ciclasa específica de cromoplastos (β LCY2) cuando se compara el pomelo rosado Star Ruby con la naranja Washington Navel (Alquezar et al., 2009); en otros casos, se observa un aumento de la expresión de genes de rutas precursoras y de los primeros pasos de la biosíntesis de carotenoides al comparar la naranja mutante Cara Cara con la naranja Washington Navel (Tao et al., 2007; Alquezar et al., 2008) y la reducción en la expresión de genes que catabolizan el licopeno en la naranja mutante Hong Anliu (Liu et al., 2007; Lu et al., 2016b). También se han descrito alelos de la β LCY2 que poseen una actividad licopeno ciclasa casi nula y podrían funcionar como limitante en este paso de la ruta, favoreciendo la acumulación de licopeno cuando se combinan con mayores niveles de expresión de enzimas precursoras (Alquezar et al., 2009; Alquezar et al., 2013; Lu et al., 2016b).

El sistema CRISPR-Cas9 fue utilizado por primera vez en cítricos de manera exitosa en 2014, en naranja y pomelo (Jia and Wang, 2014a; Jia and Wang, 2014b) y en los años posteriores, se lograron grandes avances (Sección 1.2.2a). En cuanto a la ruta de síntesis de carotenoides, además de generar mutantes del gen *CsPDS* para optimizar la herramienta, se ha utilizado la edición génica para obtener mutantes *knockout* de la enzima Licopeno β -ciclasa 2 (*CsLCY2*) específica de frutos en el citrange Carrizo y naranjas sanguíneas (Tarocco y Sanguigno, que producen antocianinas en sus frutos) (Salonia et al., 2022). El objetivo fue obtener frutos con acumulación de antocianinas y licopeno a la vez.

Si bien se han obtenido importantes avances en cítricos utilizando la edición génica, la transformación y edición (libre o no de transgenes) son procesos largos y laboriosos que no se han logrado con éxito en todas las especies de cítricos. La capacidad de regeneración y transformación es altamente variable dependiendo de la especie o incluso del genotipo dentro de la misma especie (Dutt and Grosser, 2009). Además, al ser especies leñosas, los tiempos de regeneración de plantas *in vitro*, de aclimatación a condiciones de campo y de evaluación de los caracteres, son extremadamente largos. En el caso de modificaciones que se expresan exclusivamente en el fruto, es necesario esperar a que la planta supere la etapa juvenil, florezca y fructifique. Las mandarinas y sus híbridos son especialmente recalcitrantes en el cultivo *in vitro* y la transformación de epicótilos mediada por *Agrobacterium* es extremadamente ineficiente (Dutt et al., 2018; Salonia et al., 2020; Moniruzzaman et al., 2021). La mayoría de las

mandarinas o sus híbridos se han logrado transformar utilizando protocolos de transformación de células provenientes de callos embriogénicos (Li et al., 2002; Dutt et al., 2018; Moniruzzaman et al., 2021). En cuanto a la edición génica, no se ha reportado aún la utilización con éxito de esta herramienta en mandarinas para obtener plantas editadas de forma estable, aunque recientemente se ha logrado editar el gen *CsPDS* de manera transitoria en hojas de mandarina Kinnow (Manchanda et al., 2023).

En este trabajo nos propusimos generar, mediante el sistema CRISPR-Cas9, alelos no funcionales de la β LCY2 en híbridos de mandarinas del programa de mejoramiento genético de INIA con el objetivo de obtener, en el largo plazo, mandarinas que acumulen licopeno en sus frutos. Para seleccionar el o los mejores genotipos candidatos para la edición, se caracterizó la ruta de síntesis de carotenoides en 4 híbridos (A218, B475, B30 y M9) y se determinó el contenido total de carotenoides para seleccionar el híbrido con mayor capacidad de acumular carotenoides. También se tomó en consideración la capacidad de los 4 híbridos de generar callos embriogénicos ya que este tejido es el que se utiliza durante el proceso de transformación y edición. También se estudiaron los alelos presentes de la enzima β LCY2 en estos híbridos, sus parentales y algunas variedades comerciales, así como la expresión génica en la pulpa durante la maduración del fruto de él o los alelos presentes.

5.2 Objetivos específicos.

- I. Determinar los niveles de carotenoides totales y de expresión de genes de enzimas de la ruta de síntesis de carotenoides durante la maduración de frutos en híbridos nacionales de mandarina.
- II. Identificar y caracterizar funcionalmente los alelos de β LCY2 que están presentes en híbridos nacionales de mandarinas y variedades comerciales. Determinar sus patrones de expresión génica durante la maduración de frutos
- III. Obtener plantas de mandarinas editadas para el gen de la enzima β LCY2 y realizar su caracterización genotípica preliminar.

5.3 Metodología

5.3.1 *Material vegetal, colecta de muestras y determinaciones de color e índice de madurez*

5.3.1a Material vegetal y condiciones de cultivo

Para la determinación de carotenoides totales durante la maduración del fruto, así como para los análisis de expresión génica de *PSY*, β LCY2a y b, ϵ LCY y β CHX, se utilizaron los híbridos de mandarinas A218, B475 (Ellendale x Mandarina común) y B30 y M9 (Ellendale x Satsuma) pertenecientes al programa de mejoramiento genético de Citrus de INIA y Facultad de Agronomía, UdelaR.

Para el genotipado de alelos de β LCY2 se incluyeron además sus parentales (Ellendale, Mandarina Común y Satsuma) y las variedades comerciales de mandarinas Clementina de Nules y Nova, los pomelos Marsh y Star Ruby, la naranja Washington Navel y el limón Lisbon. Para el genotipado se colectaron hojas jóvenes de cada genotipo y se almacenaron a 4 °C hasta la extracción de ADN.

En el análisis posterior de la expresión de los alelos a y b de β LCY2 se utilizaron los híbridos A218, B475, B30, M9 y las variedades Clementina de Nules, Nova, Marsh, Star Ruby, Washington Navel y Lisbon.

Las plantas utilizadas se encuentran en las estaciones experimentales de INIA Salto Grande y EEFA, UdelaR en el departamento de Salto, Uruguay. Están injertadas sobre *Poncirus trifoliata* y sujetas a las prácticas de manejo estándar del cultivo.

5.3.1b Colecta de pulpa para determinación de carotenoides y extracción de ARN

Se cosecharon entre 10 y 20 frutos de cada genotipo en cada estadio de desarrollo durante las zafas 2017 (Año 1), 2018 (Año 2) y 2019 (Año 3) entre los meses de febrero y agosto. Los estadios de desarrollo del fruto [Verde Inmaduro (VI), Verde Maduro (VM), Cambio de Color (CC) y Maduro (M)] fueron determinados por el color de la piel y la pulpa (Alquezar et al., 2013). Se muestreó la pulpa colectando material de 2 segmentos de cada fruto con un bisturí, y se combinaron para cada genotipo, se congelaron y molieron en nitrógeno líquido y almacenaron a -80 °C hasta la extracción de carotenoides y de ARN.

5.3.1c Determinación de color e índice de madurez

El color de la piel y la pulpa se midió utilizando un colorímetro CR-400 (Konica Minolta Óptica, Inc. Japón). Se tomaron medidas en tres lugares alrededor del plano ecuatorial de la fruta para la piel y la pulpa. Se determinaron los parámetros L, a y b de Hunter y el índice de color se expresó como $IC = 1000 \cdot a / (L \cdot b)$. Los valores negativos corresponden a frutos verdes; los valores cercanos a cero corresponden a frutos amarillos y los valores positivos corresponden a frutos anaranjados. Se utilizaron 20 repeticiones (frutos) para cada estadio de desarrollo y genotipo (Arruabarrena et al., 2019). Se extrajo el jugo de 20 frutos en el estadio de desarrollo M de cada genotipo, utilizando un exprimidor eléctrico de uso doméstico, se filtró a través de un tamiz metálico y se analizó inmediatamente. La acidez se determinó mediante titulación con NaOH 0,1 N. El contenido de sólidos solubles (°Brix) fue determinado utilizando un refractómetro digital (modelo DBX-55, ATAGO Co., Ltd., Japón). El índice de madurez se expresa como la relación °Brix/acidez (Rodrigo et al., 2003).

5.3.2 Determinación de carotenoides totales en pulpa

Para la extracción se utilizó un gramo de pulpa molida congelada. Se agregaron 2 mL de una mezcla de metanol:acetona:diclorometano (25:25:50 v/v) a cada tubo y luego se vortexó, sonizó y centrifugó (3000 x g, 3 min a 4 °C). La fase orgánica coloreada se recuperó en un tubo nuevo y la fase acuosa se volvió a extraer con 1,5 mL de diclorometano, como se describe en el paso anterior. Se recuperó la fase orgánica, combinándola con la anterior. Se repitió la extracción de la fase acuosa hasta que la fase orgánica quedó incolora. Se midió la absorbancia a 450 y 540 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Visible (Evolution 260 Bio, Thermo Scientific) (Arruabarrena et al., 2019). El contenido total de carotenoides se calculó como el equivalente de β -caroteno utilizando el coeficiente de extinción de β -caroteno $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 2500$ (Rodrigo et al., 2003). Se realizaron tres extracciones para cada muestra. Todos los pasos se llevaron a cabo en frío y con luz tenue, protegiendo las muestras de la luz con papel aluminio. Se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) para determinar diferencias significativas en los niveles de carotenoides utilizando la prueba LSD Fisher. Letras diferentes indican diferencias significativas con valores $p < 0,05$.

5.3.3 Extracción de ARN, retrotranscripción y PCR en tiempo real

El ARN total de la pulpa se extrajo de acuerdo con el protocolo descrito en Alquézar (2007). Se trataron 2 μ g de ARN total se trataron con DNaseI (New England Biolabs, USA) y se usaron como molde para sintetizar ADN copia (ADNc) (Reveraid RT, Thermo Scientific™) utilizando cebadores oligoDT (QIAGEN,

Hilden, Alemania), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizó una dilución ¼ del ADNc y se utilizaron 2 µL para las reacciones de PCR cuantitativo (qPCR). Las reacciones de qPCR se realizaron en el equipo StepOne Plus™ (Applied Biosystems) utilizando el kit SensiFAST™SYBR® Hi-ROX Kit (Meridian Bioscience®, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizaron cebadores para actina como gen calibrador y cebadores específicos para PSY, βLCY2a, βLCY2b, εLCY y βCHX (Alquezar et al., 2009; Alquezar et al., 2013; Alós et al., 2014; Lana et al., 2020). Las secuencias y temperaturas de annealing de los cebadores se detallan en la Tabla 8. Los niveles de expresión de los genes se calcularon utilizando el método de Pfaffl, que considera las eficiencias de las reacciones de PCR (Pfaffl, 2001). Se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) para determinar diferencias significativas en los niveles de expresión génica, utilizando la prueba LSD Fisher. Las letras diferentes indican diferencias significativas con valores $p < 0,05$.

5.3.4 Extracción de ADN, clonado, secuenciación y genotipado

Las extracciones de ADN genómico se realizaron siguiendo el protocolo descrito en Arruabarrena *et al.* (2016). Se amplificaron mediante PCR las secuencias genómicas del gen que codifica la βLCY2 utilizando los cebadores citBLCY2gen-F y citBLCY2gen-R (Tabla 8) con el kit MyFi™ Mix 2X (Meridian Bioscience®, USA) y los amplicones fueron clonados en el vector T pCR™2.1 usando el TA Cloning® Kit (Thermo Scientific™), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron 5 µL de ligación para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* XL1 Blue con protocolos estándar (Sambrook et al., 1989). Se seleccionaron colonias positivas analizadas por PCR, a partir de las cuales se purificó el ADN plasmídico y los insertos fueron secuenciados usando los cebadores m13 *forward* y reverso (Macrogen Inc., Korea). El genotipado se realizó mediante CAPS, digiriendo el producto de PCR que amplifica el gen completo de βLCY2 con la enzima *RsaI*, que solamente corta en el alelo a de la βLCY2. Los productos de la digestión se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1%.

Para determinar la proporción de transcritos en M9 se realizó un PCR utilizando como molde el ADNc del estadio CC y se clonó en el vector pCR™2.1. Las colonias blancas se analizaron mediante PCR de colonia y los productos fueron digeridos con *RsaI*, para determinar si se trataba del alelo a o el b en cada caso.

Tabla 8. Listado de cebadores utilizados en el Capítulo 3. Se indica el nombre, la secuencia, temperatura de *annealing* y referencia bibliográfica. Los sitios de restricción se encuentran subrayados.

Nombre	Secuencia 5'→3'	Temperatura de <i>annealing</i>	Referencia
citPSY1-F	GGTCGTCCATTTGATATGCTTG	59 °C	(Alós et al., 2014)
citPSY1-R	CCTAAGGTCCATCCTCATTCCT		
citBLCY2a-F	GAGCAAGTCTCATCGCGTCATAGTG	59 °C	(Alquezar et al., 2013)
citBLCY2a-R	ACTTTAGCCTTATGAAACTTAACTCCATTG		
citBLCY2b-F	GCAAGTCTCATCGCGTCATGGTA	59 °C	(Alquezar et al., 2013)
citBLCY2b-R	ACTTTAGCCTTATGAAACCTAACGCCATTTA		
citE-LCYF	AAGGTGTGTCGAGTCAGGTGTTT	59 °C	(Lana et al., 2020)
citE-LCYR	CCTGCAGGGGACAATCATATCATGTT		
citBCHX1-F	GGCTCATAAAGCTCTGTGGC	61 °C	(Alquezar et al., 2009)
citBCHX1-R	CCAGCACCAAAACAGAGACC		
citACT-F	TTAACCCCAAGGCCAACAGA	59 °C	(Alós et al., 2014)
citACT-R	TCCCTCATAGATTGGTACAGTATGAGAC		
citBLCY2gen-F	GCAATGGCAACTCTTCTTAGCCCG	58 °C	(Alquezar et al., 2009)
citBLCY2gen-R	GCCTCGAGATCTTCAAATGGTTTCAAG		
BLCY2- <i>Bgl</i> II fwd	CTGCGCAGATCTATGGCAACTCTTCTTAGCC	51 °C	Este trabajo
BLCY2- <i>Sac</i> I rev	CAAGAACATTGAGCTCTCAAATGGTTTCAAGGGC		
βLCY2geno-F	AACCTTCACGAGTGGTGTCC	60 °C	Este trabajo
βLCY2geno-R	CTCAATATCTGGCGGGTTGT		Este trabajo
Pp6-fwd	CATTCGCCGCCAAGTTCTTC	55 °C	Este trabajo
Pp6-rev	GGTGCCCTGAATGAACTCCA		Este trabajo
βLCY2ed-fwd (cebador A)	GGATCATCATCATCATCACAGGA	56 °C	Este trabajo
βLCY2ed-rev (cebador B)	CGACCGTAGGGCCTGTCTA		Este trabajo
βLCY2-HRM-fwd	CAGGATCCGGACAAGCAAGT		Este trabajo
βLCY2-HRM-rev*	GCWGGTCCAGTGCCAATGAT		Este trabajo

*W= A o T

Clonado de alelos a y b de βLCY2 en vector de expresión bacteriano pET28a

Se diseñaron los cebadores BLCY2-*Bgl*II fwd y BLCY2-*Sac*I rev (Tabla 8), que incluyen los sitios de restricción *Bgl*II y *Sac*I, para el clonado direccional en pET28a (Novagen®). Estos cebadores se utilizaron para amplificar la secuencia codificante de βLCY2 utilizando como molde el ADN plasmídico que contienen el alelo a o b del genotipo M9. Se generó un sitio de restricción para *Bgl*II, ya que esta enzima genera extremos cohesivos que son compatibles con los de *Bam*HI. No se utilizó el sitio *Bam*HI ya que la secuencia codificante de βLCY2 contiene un sitio de corte para esta enzima. Se realizó una digestión secuencial con *Bgl*II y *Sac*I y se purificó el producto de digestión. Se clonaron ambos fragmentos en el vector pET28a linealizado con las enzimas *Bam*HI y *Sac*I utilizando la T4 DNA ligasa (Thermo Scientific), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizaron 10 µL de ligación para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* XL1 Blue utilizando protocolos estándares (Sambrook et al., 1989). Las colonias resistentes a kanamicina se analizaron por PCR de colonia y se secuenciaron.

5.3.5 Complementación heteróloga en bacterias carotenogénicas

Se transformaron construcciones para expresión en bacterias con las secuencias codificantes de los alelos a y b de la β LCY2 clonados en el vector pET28a, en la cepa de *E. coli* DS1B- Δ crtY, productora de licopeno (NIKLIITSCHKE et al., 2008). Como control se utilizó la misma cepa transformada con el plásmido pET28a y la cepa *E. coli* DS1B, productora de β -caroteno (Tabla 9).

Tabla 9. Cepas bacterianas utilizadas en el capítulo 3.

Cepa	Resistencia
<i>E. coli</i> XL1Blue	--
<i>E. coli</i> BL21-Gold DS1B	Cloranfenicol
<i>E. coli</i> BL21-Gold DS1B- Δ crtY	Cloranfenicol
<i>E. coli</i> BL21-Gold DS1B- Δ crtY-pET28a	Cloranfenicol + kanamicina
<i>E. coli</i> BL21-Gold DS1B- Δ crtY- β LCY2a	Cloranfenicol + kanamicina
<i>E. coli</i> BL21-Gold DS1B- Δ crtY- β LCY2b	Cloranfenicol + kanamicina
<i>A. tumefaciens</i> EHA105- Cas9- β LCY2-177-242	Rifampicina + espectinomicina + kanamicina

5.3.5a Transformación de *E. coli* DS1B- Δ crtY con construcciones pET28a- β LCY2a (M9), pET28a- β LCY2b (M9) y pET28a

Se tomó con un asa microbiológica una cantidad generosa de bacterias *E. coli* DS1B- Δ crtY provenientes de una placa fresca, se resuspendieron en 100 μ L de CaCl_2 0,1 M y se incubaron en hielo por 60 min. Se prepararon 3 tubos, uno para cada transformación. A continuación, se agregó 1 μ L de plásmido correspondiente a cada tubo y se incubó en hielo por 60 min adicionales. Se realizó un *shock* térmico a 42 °C por 1 min y se volvieron a incubar los tubos en hielo por 5 min. Luego se agregó 1 mL de LB a cada tubo y se incubaron a 37 °C con agitación vigorosa por 60 min. Se plaquearon 50 y 200 μ L de cada tubo en placas de LB-agar con kanamicina a una concentración final 50 μ g/mL. Las placas se incubaron a 37 °C por 16 h. Las colonias aisladas se estriaron en el mismo medio de cultivo y luego se analizaron por PCR de colonia para confirmar la presencia del plásmido utilizando los cebadores BLCY2-*Bgl*IIfwd y BLCY2-*Sac*Irev (Tabla 8) y se secuenciaron para corroborar el correcto clonado. Se seleccionaron 3 colonias diferentes para cada construcción y se almacenaron en glicerol a -80 °C.

5.3.5b Ensayos de complementación heteróloga

Se realizó un precultivo de 5 mL de LB con las cepas bacterianas y los antibióticos correspondientes (*E. coli* DS1B, DS1B- Δ crtY, DS1B- Δ crtY-2a; DS1B- Δ crtY-2b y DS1B- Δ crtY-pET28a) (Tabla 9). Los precultivos se incubaron 16 h a 37 °C con agitación vigorosa. Se inocularon 50 mL de LB con antibióticos con 1 mL de precultivo. Se preparó un cultivo por cada cepa bacteriana. Los cultivos se incubaron a 37 °C con agitación vigorosa y se monitoreó la OD₆₀₀. Cuando los cultivos alcanzaron OD₆₀₀ de entre 0,5 y 0,8 se incubaron a 30 °C por 48 h. A continuación, se tomaron 10 mL del cultivo para determinar peso seco (PS) y 30 mL para realizar las extracciones de carotenoides. Los cultivos se centrifugaron a 4500 x g a 20 °C por 15 min. Se descartó el sobrenadante y los pellets provenientes de cultivos de 10 mL se pesaron y se secaron a 50 °C por 48 h; luego se pesaron y se estimó el PS por mL de cultivo. Los pellets provenientes de cultivos de 30 mL se utilizaron para la extracción de carotenoides. Se realizaron tres repeticiones del ensayo, utilizando una de las colonias almacenadas previamente por cada repetición.

5.3.5c Extracción y análisis de carotenoides

Todos los pasos se realizaron en condiciones de semioscuridad y en hielo. Las centrifugaciones se realizaron a 4 °C. La extracción de carotenoides se basó en el método para levaduras descrito por An, *et al.* (1989) con algunas modificaciones que se detallan a continuación.

Extracción

Los pellets bacterianos se resuspendieron en 5 mL de agua destilada mediante agitación con vortex y se transfirieron a tubos Falcon de 15 mL. Se volvieron a centrifugar (4000 x g durante 10 min) y se descartó el sobrenadante. Este paso se realizó dos veces para eliminar restos de medio de cultivo. A continuación, cada pellet se resuspendió en 1 mL de agua destilada mediante agitación con vortex por 5 min. Una vez resuspendido el pellet, se agregó 1 mL de acetona y se vortexeó durante 5 min. A continuación, se centrifugó a 4000 x g por 10 min. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se repitió este paso hasta que el pellet bacteriano quedó incoloro, juntando todos los sobrenadantes de cada paso en el mismo tubo. Se agregaron 2 mL de acetona al tubo que contenía los sobrenadantes, se vortexeó y centrifugó a 4000 x g por 5 min. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, de vidrio templado con tapa. Este paso se repitió 3 veces. Se agregaron 2 mL de éter de petróleo, se vortexeó y se centrifugó a 4000 x g por 5 min. Se transfirió la fase orgánica a un tubo falcon de 15 mL, se congeló en nitrógeno líquido y se liofilizó. Las muestras liofilizadas se resuspendieron en 500 µL de acetona y se almacenaron a -80 °C. Se midieron 5 µL de muestra diluida en 595 µL de acetona a 474 nm con un espectrofotómetro. El contenido total de carotenoides se calculó como el equivalente de β-caroteno utilizando el coeficiente de extinción de β-caroteno $E_{1\%}^{1\text{cm}}=2500$ (Rodrigo *et al.*, 2003).

Análisis de carotenoides por HPLC

Se utilizó un sistema de cromatografía líquida Shimadzu modelo LC-10AT equipado con un detector de matriz de diodos (HPLC-DAD). Se inyectó el extracto de carotenoides (10 µL) y los pigmentos se separaron mediante HPLC usando una columna de fase reversa RP-18 Lichrocart 125-4 (Merck) con acetonitrilo:metanol:isopropanol (85:10:5 v/v) como fase móvil con un flujo isocrático de 1 mL/min a temperatura ambiente. El licopeno y el β-caroteno se identificaron mediante sus tiempos de retención y espectros de absorción. Los datos se analizaron utilizando el software LabSolutions de Shimadzu (Moreno and Stange, 2022). Para calcular la proporción de cada pigmento se calculó el área bajo la curva para cada pico. La suma del área de los picos presentes en cada muestra representa el 100%.

5.3.6 Edición del gen βLCY2

5.3.6a Diseño de ARN guías, evaluación de eficiencia *in vitro* y construcción de vectores.

Se diseñaron dos ARN guías específicos para la secuencia codificante de licopeno β-ciclasa 2 (βLCY2) (*orange1.1g010693m*) utilizando el software CRISPOR (Haeussler *et al.*, 2016). Los sitios blanco de estos ARN guía están ubicados en posiciones con secuencias idénticas para los alelos a y b y cercanas al codón de inicio de la traducción ATG en las posiciones +177-197 (blanco 1) y +242-2620 (blanco 2). La eficiencia *in vitro* de ambos ARN guías se evaluó de acuerdo a Fleitas *et al.* (2022). Para ello se amplificó una región genómica de 3321 pb que contiene ambos sitios blanco, utilizando los cebadores βLCY2geno-F y βLCY2geno-R (Tabla 8). Las secuencias de los ARN guías fueron clonadas en el vector binario pDIRECT22C (Čermák *et al.*, 2017) con el sistema Golden Gate. La construcción resultante (Cas9-βLCY2-177-242) se introdujo en *A. tumefaciens* EHA105 y se utilizó para la transformación de callos embriogénicos.

5.3.6b Transformación de callos embriogénicos de B30 y regeneración de plantas

La transformación de callos embriogénicos del genotipo B30 se basó en el protocolo descrito en Li, *et al.* (2002) con algunas modificaciones. Luego de dos semanas del repique en medio EME-S sólido, los callos embriogénicos con crecimiento exponencial se transfirieron a medio MT líquido suplementado con 0,5 g/L de extracto de malta, 1,5 g/L de glutamina, 50 g/L de sacarosa y 2mg/L de acetosiringona. Se incubaron a 25 °C en semioscuridad con agitación (140 rpm) durante 4 días. El tercer día se realizó un precultivo la cepa de *A. tumefaciens* EHA105 transformada con la construcción Cas9- β LCY2-177-242 en 10 mL medio LB suplementado con 250 μ g/mL de rifampicina, 50 μ g/mL de espectinomicina y 50 μ g/mL de kanamicina que se incubó a 28 °C con agitación toda la noche. El cuarto día se inocularon 5 mL de precultivo a 45 mL de LB suplementado con 50 μ g/mL de espectinomicina y 50 μ g/mL de kanamicina. El cultivo se incubó a 28 °C con agitación hasta que alcanzó una OD₆₀₀ de 0,6-0,8. A continuación se centrifugó el cultivo durante 10 min a 2500 x g. El pellet de bacterias se resuspendió en medio de cultivo MT líquido con 100 μ M de acetosiringona hasta obtener una OD₆₀₀ de 0,5. A continuación, se incubó a 25 °C con agitación leve (60 rpm) durante 20-30 min. Durante este tiempo, se prepararon los callos para la transformación. Se eliminó el medio líquido colando los callos con un tamiz de cocina con papel de filtro estéril y se colocaron en placas de Petri estériles de 4,5 cm de diámetro. Se agregó en cada placa suspensión bacteriana hasta cubrir los callos, se sellaron las placas con Parafilm y se incubaron a 25 °C con agitación durante 25 min en semioscuridad. A continuación, se eliminó la suspensión bacteriana utilizando una pipeta Pasteur estéril y se colocaron los callos sobre papel absorbente estéril para eliminar el exceso de líquido. Los callos se colocaron en placas de Petri con medio EME-S sólido suplementado con acetosiringona 100 μ M y se incubaron en oscuridad a 25 °C durante 48 h. Se colocaron los callos en placas de Petri y se realizaron 2 lavados de 15 min cada uno con medio EME-S líquido suplementado con 250 μ g/mL de cafotaxima y 1 lavado de 15 min con EME-S suplementado con 250 μ g/mL de cafotaxima y 100 μ g/mL de kanamicina. Se eliminó el exceso de líquido colocando los callos sobre papel absorbente estéril y luego se colocaron en placas con medio EME-S sólido suplementado con 250 μ g/mL de cafotaxima y 100 μ g/mL de kanamicina. Los callos se transfirieron a medio fresco cada 3-4 semanas y luego de 2 a 3 meses se individualizaron los callos resistentes a kanamicina. Una vez obtenida una cantidad significativa de callos de cada línea se transfirieron a medio EME-maltosa (EME-M) con 250 μ g/mL de cafotaxima y 100 μ g/mL de kanamicina. Una vez regenerados los embriones se transfirieron a medio MT sólido suplementado con 1 μ g/mL de ácido giberélico. Se transfirieron a medio fresco cada 30 días. Cuando se obtuvieron brotes, éstos fueron injertados *in vitro* sobre *Poncirus trifoliata*. Luego, se sobreinjertaron *ex vitro* sobre limón rugoso y se mantuvieron cubiertos con nylon hasta su correcta aclimatación. La composición de los medios de cultivo utilizados en el proceso de transformación puede consultarse en Grosser & Gmitter (2011).

5.3.6e Genotipado de callos y plántulas en regeneración

Los callos resistentes a kanamicina fueron genotipados para determinar la presencia de la construcción génica en primer lugar y posteriormente, la presencia de mutaciones en el locus blanco, así como la naturaleza de las mismas. En primer lugar, se extrajo ADN genómico de cada línea resistente a la kanamicina, utilizando el método de citrato (Arruabarrena et al., 2016). La presencia del T-DNA de la construcción génica utilizada en la transformación se confirmó mediante PCR utilizando los cebadores Pp6-fwd y Pp6-rev que amplifican la región codificante correspondiente al gen *nptII*.

Para la detección de mutaciones en el locus blanco (β LCY2), se realizaron *pools* de restos de 4-5 plántulas que permanecen luego del repique de un mismo frasco. Se extrajo ADN genómico de 3 *pools*

de dos líneas diferentes: B30 ST_BM y B301M. Para detectar posibles mutaciones se realizó un análisis de desnaturalización de alta resolución (HRM) de amplicones obtenidos mediante qPCR. Para la amplificación se utilizó el kit SensiFAST™ HRM Kit (Meridian Bioscience®, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Como molde se utilizaron diluciones de ADN de B30 wt, B30 ST_BM y B301M con una concentración de 100 ng/μL. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 10 μL con 100 ng de ADN, 1X SensiFAST™ HRM Kit y 300nM de cada cebador (βLCY2-HRM-fwd y βLCY2-HRM-rev, Tabla 8). La amplificación y curva de desnaturalización se llevaron a cabo en un termociclador en tiempo real Rotor-Gene Q (QIAGEN). Las condiciones de amplificación y desnaturalización fueron las siguientes: 1 paso a 95 °C durante 3 min, 40 ciclos de 2 pasos de 95 °C 5 s y 60 °C 15 s, un paso de 72 °C 60 s seguido de un paso de 50 °C 30 segundos y la curva del melting con una rampa de 76 a 86 °C con un incremento de 0,1 °C por paso y una espera de 2 s luego de cada paso. La adquisición de fluorescencia se llevó a cabo en la amplificación durante los pasos de 60 s con el canal verde y durante la curva de desnaturalización con el canal HRM. Los resultados se analizaron con el software Rotor-Gene Q series Software (QIAGEN).

Las muestras en las que se observaron diferencias en las curvas de desnaturalización de alta resolución (HRM) se utilizaron para amplificar la región del gen blanco que contiene los dos sitios de los ARN guías utilizados con los cebadores βLCY2ed-fwd y βLCY2ed-rev (Tabla 8). Los amplicones obtenidos fueron secuenciados con el método Sanger. Los cromatogramas de las secuencias obtenidas se analizaron con el software de deconvolución “ICE analysis” de Synthego (<https://ice.synthego.com/#/>) para inferir las posibles mutaciones generadas y su impacto en la actividad enzimática de las proteínas codificadas por los alelos mutantes.

5.4 Resultados

5.4.1 Caracterización de acumulación de carotenoides totales y expresión de genes de enzimas de la ruta de síntesis de carotenoides durante la maduración.

Con el objetivo de caracterizar los híbridos de mandarinas A218, B475, B30 y M9 pertenecientes al programa nacional de mejoramiento genético de citrus y determinar cuál de ellos tiene mayor capacidad de acumular carotenoides en la pulpa, se evaluó el contenido de carotenoides totales durante el desarrollo y maduración del fruto en dos años (año 1 y 2). Para corroborar los estadios de madurez de los frutos colectados en ambos años, se realizaron análisis de calidad de fruta que mostraron valores ajustados a lo esperado (Lado et al., 2014), excepto en acidez donde algunos genotipos permanecieron con valores altos al momento de la cosecha (mayores a 1,4) (Tabla 10). Como se observa en la Figura 15, los 4 genotipos analizados presentan un aumento gradual del contenido de carotenoides totales a lo largo del desarrollo y la maduración del fruto. Los contenidos de carotenoides alcanzados en la madurez fueron mayores en el año 1 en comparación con el año 2 para los 4 genotipos. B30 fue el genotipo que acumuló mayor contenido de carotenoides en ambos años ($39,24 \pm 0,60$ μg/g PF de pulpa en año 1 y $36,0 \pm 0,57$ μg/g PF de pulpa en año 2). Además, se determinó el contenido de carotenoides totales en la pulpa de los parentales de estos híbridos en estadio Maduro, siendo Ellendale el genotipo con mayor contenido en ambos años ($54,9 \pm 0,33$ μg/g PF en el año 1 y $35,0 \pm 0,49$ μg/g PF en el año 2). Satsuma registró valores de $17,2 \pm 0,33$ μg/g PF y $13,9 \pm 0,15$ μg/g PF para los años 1 y 2, respectivamente. En el caso de Mandarina Común solamente se analizó el contenido de carotenoides en el año 2, donde se observó un contenido de $13,4 \pm 0,18$ μg/g PF.

Tabla 10. Calidad de fruta al momento de la cosecha en el estadio Maduro e ICC interno y externo para los estadios de madurez Verde Maduro, Cambio de Color y Maduro para los años 1 y 2.

	2017				2018			
	A218	B475	B30	M9	A218	B475	B30	M9
% de jugo	41,86	46,34	51,93	35,94	38,04	47,60	51,55	41,07
Contenido de sólidos solubles	11,82	14,85	17,35	11,63	11,21	11,79	16,17	13,70
Acidez titulable	1,65	1,53	1,54	1,37	1,29	1,30	1,91	1,52
Índice de madurez (SS/Acidez)	7,17	9,69	11,24	8,51	8,71	9,08	8,44	8,98
ICC interno								
Estadio de madurez	A218	B475	B30	M9	A218	B475	B30	M9
Verde Inmaduro (VI)	-4,73±0,04	-2,06±0,16	-2,02±0,30	x	-3,32±0,07	-3,18±0,10	-3,61±0,11	-2,90±0,17
Verde Maduro (VM)	2,27±0,23	3,99±0,18	6,07±0,18	-3,82±0,25	2,52±0,14	-1,32±0,31	-1,25±0,40	-1,60±0,15
Cambio de Color (CC)	3,38±0,21	5,86±0,23	4,90±0,19	4,72±0,18	5,11±0,16	3,28±0,11	5,30±0,19	5,28±0,14
Maduro (M)	7,28±0,12	7,62±0,10	7,83±0,11	6,47±0,50	6,52±0,08	5,89±0,14	7,90±0,11	6,32±0,14
ICC externo								
Estadio de madurez	A218	B475	B30	M9	A218	B475	B30	M9
Verde Inmaduro (VI)	-21,06±0,38	-19,80±0,38	-16,80±0,36	x	-20,64±0,46	-19,97±0,50	-21,85±0,47	-19,14±0,26
Verde Maduro (VM)	-9,05±0,58	-11,28±0,64	-11,51±0,28	-16,30±0,44	-15,23±0,44	-16,61±0,43	-13,31±0,21	-14,25±0,36
Cambio de Color (CC)	3,31±0,40	-2,89±0,52	-0,82±0,54	0,79±0,43	0,30±0,91	-6,14±0,46	-3,09±0,40	4,89±0,41
Maduro (M)	9,86±0,15	7,75±0,16	8,76±0,15	9,72±0,26	9,91±0,17	7,30±0,21	7,83±0,09	10,75±0,21

Los valores de ICC representan las medias ± EE. x= sin datos

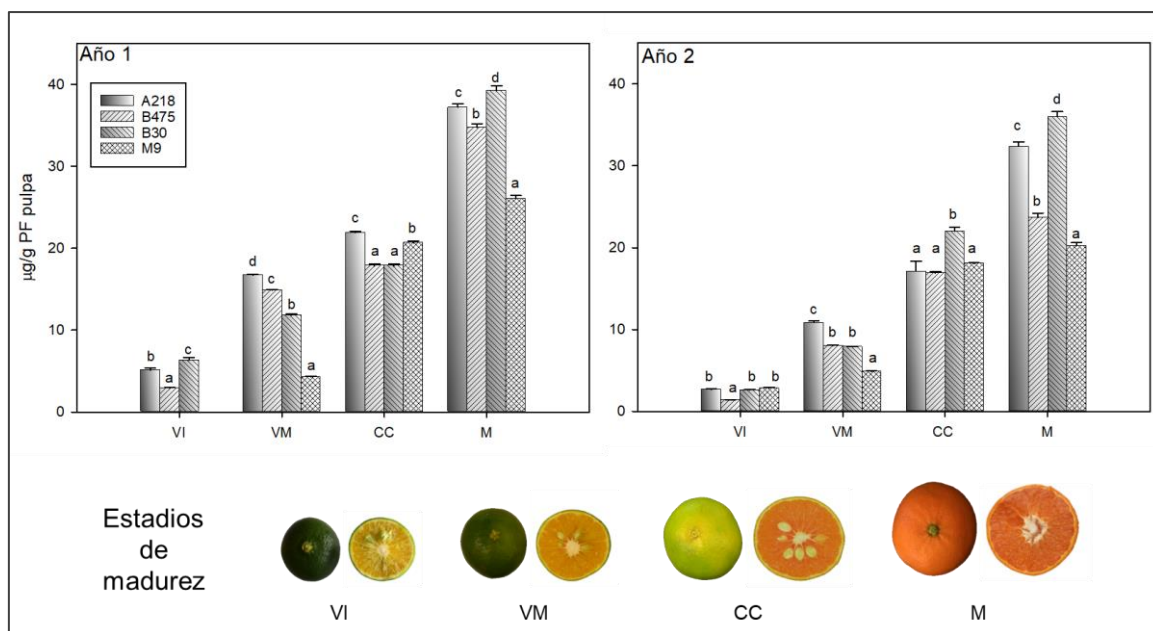


Figura 15. Acumulación de carotenoides totales en pulpa durante el periodo de desarrollo y maduración del fruto para A128, B574, B30 y M9 durante el año 1 y el año 2. VI: Verde Inmaduro, VM: Verde Maduro, CC: cambio de color, M: Maduro. Dentro de cada estadio de desarrollo y madurez letras diferentes indican diferencias significativas entre genotipos ($p < 0,05$). Debajo se muestra la imagen de un fruto representativo de B30 para cada estadio.

En segundo lugar, se analizó la expresión de genes que codifican para las enzimas PSY, β LCY2a y b y β CHX pertenecientes a la ruta de síntesis de carotenoides durante el desarrollo y la maduración del

fruto de los 4 genotipos. Los resultados mostraron que la expresión de estos genes varía durante el desarrollo y entre los genotipos (Figura 16). A grandes rasgos, se observa un aumento en los niveles de expresión para todos los genes analizados en los 4 genotipos, a excepción del alelo a de β LCY2 en A218 y B475 donde no se detectó su expresión. Para A218, se observa un patrón similar para todos los genes analizados, con un aumento marcado en el estadio VM, que tiene un máximo de expresión en CC y un descenso en el estadio M a niveles similares a los detectados en VM. En el caso de B475, se observa un aumento paulatino en los niveles de expresión de *PSY* que se mantiene en CC y M. Para β LCY2b se observa un aumento de la expresión en VM, con un máximo en CC que en el estadio M desciende a niveles similares para VM, mientras que no se observan cambios significativos en la expresión de β CHX, con una leve tendencia a un aumento paulatino en su expresión. En B30, se observan patrones similares para *PSY* y β CHX con un aumento marcado en el estadio CC, volviendo a niveles similares a VI en el estadio M. En cambio, se observan patrones diferentes de expresión para los alelos a y b de β LCY2 con una inducción en VM que se mantiene constante para β LCY2a y una inducción paulatina con un máximo en CC que luego desciende en M a niveles similares a los de VM para β LCY2b. En el genotipo M9, se observan patrones similares para los 4 genes, con un aumento marcado en VM, que desciende en CC a niveles similares a VI y vuelve a subir en M. La expresión del gen que codifica para ϵ LCY no se detectó en ninguno de los genotipos. Se observa que, en cada genotipo, los genes tienen patrones de expresión similares entre sí. A la vez, los patrones de expresión génica de estos genes son similares entre los genotipos A218 y B475, mientras que B30 y M9 presentan patrones diferentes.

Debido a la ausencia de expresión del alelo a de β LCY2 en A218 y B475 se decidió profundizar en la caracterización de los alelos presentes en los híbridos analizados, sus parentales y algunas variedades comerciales de diferentes especies de cítricos.

Por otra parte, en base a los resultados de contenido de carotenoides totales en pulpa y a la capacidad de generar callos embriogénicos, se seleccionó al genotipo B30 para los trabajos de transformación y generación de alelos defectuosos de β LCY2, ya que fue el genotipo que acumuló más carotenoides en ambos años analizados. Además, B30 presenta un aumento significativo de la expresión de *PSY* en el estadio CC que corresponde con el inicio de la acumulación masiva de carotenoides en el fruto.

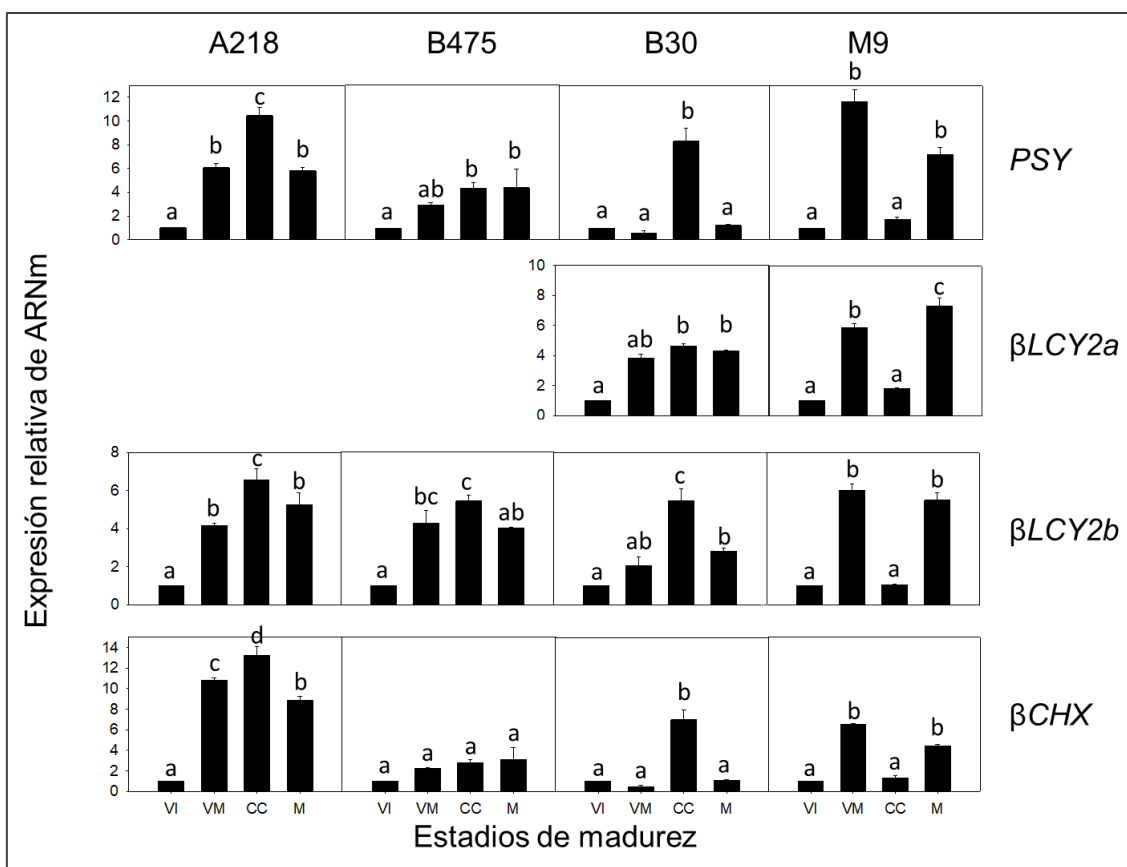


Figura 16. Expresión de los genes *PSY1*, *βLCY2a*, *βLCY2b* y *βCHX* de la ruta de carotenoides durante el desarrollo y maduración del fruto para A128, B574, B30 y M9 en el año 2. VI: Verde Inmaduro, VM: Verde Maduro, CC: Cambio de Color, M: Maduro. Los cálculos de la expresión relativa se realizaron con el método de Pfaffl con relación al valor del estadio VI para cada genotipo. Se muestran las medias $\pm$ EE. Para cada genotipo, letras diferentes indican diferencias significativas entre genotipos ($p < 0,05$).

5.4.2 Análisis de alelos de *βLCY2* presentes en híbridos de mandarinas de interés y en variedades comerciales.

Con el objetivo de diseñar una estrategia para poder discriminar los alelos a y b de *βLCY2* sin necesidad de secuenciar el gen completo, se alinearon las secuencias disponibles de estos alelos en la base de datos de NCBI (alelo a: *C. clementina* XM_006424132.2, *C. sinensis* W. Navel OP441054.1; alelo b: *C. sinensis* W. Navel OP441055.1 y *C. paradisi* Star Ruby FJ516404.1) y se detectó un polimorfismo en la posición +200 pb que genera un sitio de restricción *RsaI* en el alelo a y que está ausente en el alelo b (Figura 17a). De esta forma, se diseñó un marcador molecular codominante, de tipo CAPS (Cleaved Amplified Polymorphism Sequence) que permite detectar la presencia de los alelos a y b simultáneamente, mediante amplificación por PCR de una región del gen *βLCY2* y digestión del amplicón con *RsaI* (Figura 17b y c). Las naranjas y pomelos presentan ambos alelos, así como las mandarinas Clementina de Nules, Nova, Común y Satsuma, mientras que el tangor Ellendale y el limón Lisbon solamente presentan el alelo b (Figura 17c). En cuanto a los híbridos del programa de mejoramiento genético de INIA, observamos que tanto A218 como B475 presentan únicamente el alelo b, mientras que B30 y M9 presentan ambos alelos. Sin embargo, luego de clonar, secuenciar y analizar las regiones codificantes para *βLCY2* de B30, M9, Satsuma, Ellendale y Mandarina común, así como las proteínas resultantes de estas secuencias, se observan algunas diferencias a nivel de secuencia nucleotídica y aminoacídica con ambos alelos en Satsuma (Figura 18).

En primer lugar, para la mandarina Satsuma se clonaron dos alelos diferentes, uno tiene la secuencia característica del alelo a mientras que el otro presenta varios SNP y una delección de 3 nucleótidos (144, 145 y 146). Entre estos cambios a nivel nucleotídico, el SNP T197A modifica el sitio *RsaI* provocando que la enzima no corte en esta secuencia y que, al genotipar utilizando el marcador CAPS, aparezca como el alelo b (Figura 17c, 18a); sin embargo, al analizar la secuencia de aminoácidos, la proteína resultante posee los aminoácidos correspondientes al alelo a en las posiciones 72 y 359, consideradas esenciales para la función licopeno ciclasa (Figura 18b). En el caso de Ellendale, se clonó la secuencia codificante y el análisis de la secuencia de aminoácidos deducida corresponde con la del alelo b (Figura 18b). Los híbridos B30 y M9 provienen del cruzamiento de Ellendale con Satsuma, por lo que la presencia de los alelos a y b se encuentra dentro de lo esperado y se confirmó por secuenciación en ambos casos (Figura 18b). A218 y B475 provienen del cruzamiento de Ellendale con Mandarina común y de acuerdo con el genotipado por CAPS, ambas presentan únicamente el alelo b (Figura 17b), lo que concuerda con los análisis de expresión génica de la β LCY2, donde solamente se detectó la expresión del alelo b durante el desarrollo y la maduración del fruto (Figura 16).

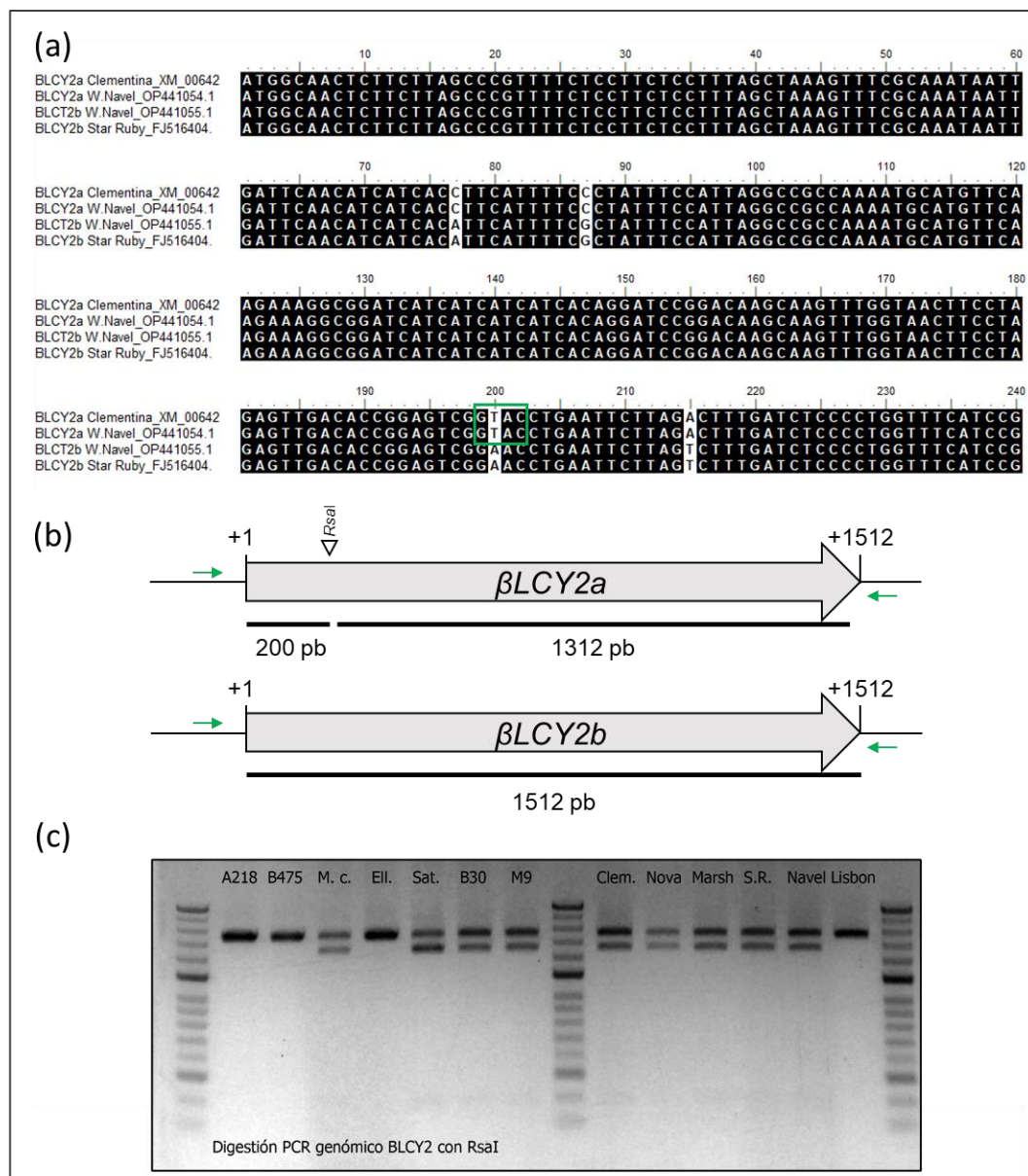
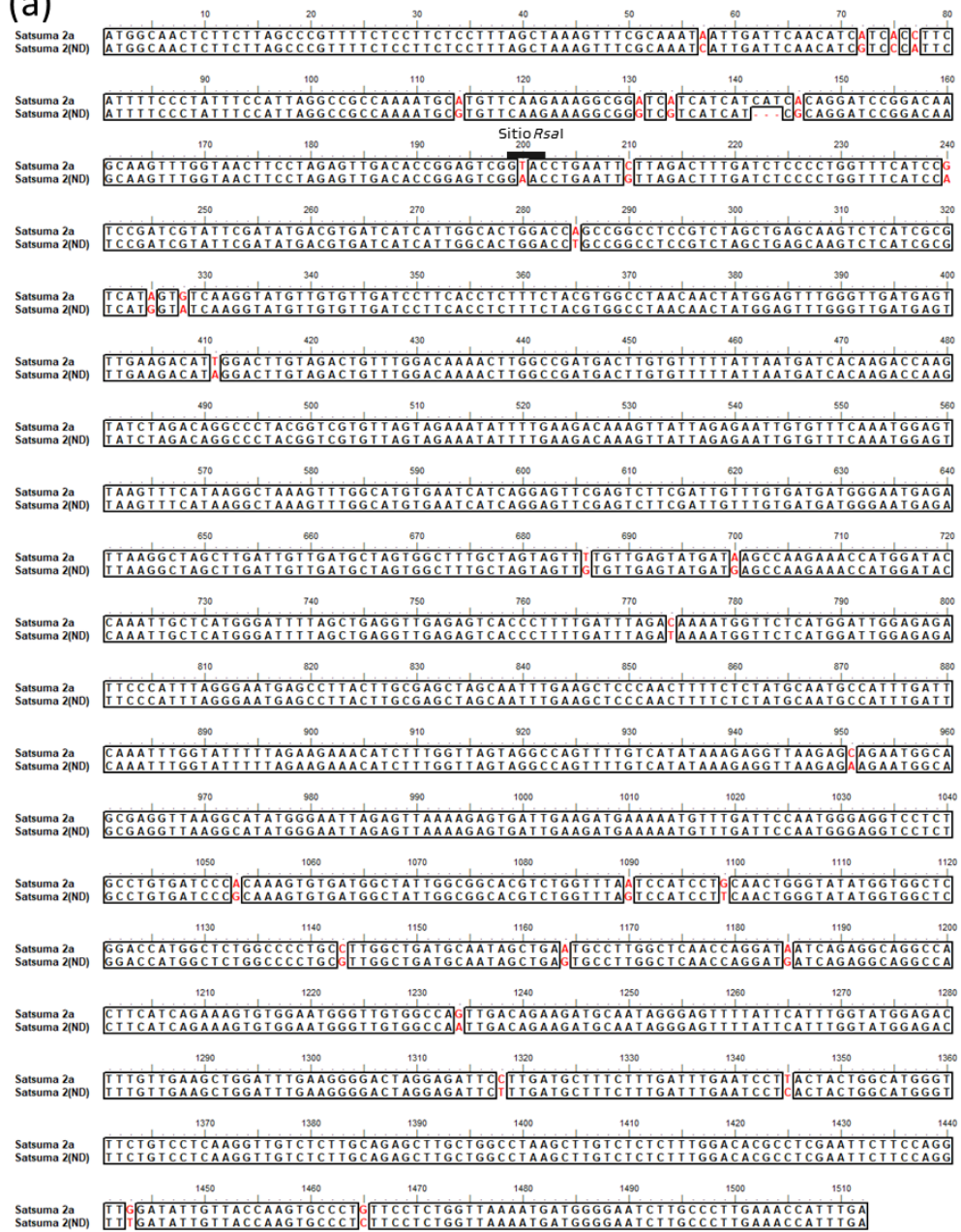


Figura 17. Diseño y genotipado por CAPS de alelos de β LICY2 presentes en híbridos nacionales (A218, B475, B30, M9) y variedades comerciales [Mandarina común (M.c.), Ellendale (Ell.), Satsuma Owari (Sat.), Clementina de Nules (Clem), Mandarina Nova (Nova), Pomelos Marsh (Marsh) y Star Ruby (S.R.), Naranja Washington Navel (Navel) y Limón Lisbon (Lisbon)]. (a) Alineamiento de los primeros 240 nucleótidos de las secuencias codificantes de los alelos a y b de β LICY2 de Clementina de Nules, W. Navel, y Star Ruby. El SNP en la posición 200 resulta en un cambio en el sitio de restricción para la enzima *RsaI* (GATC). El sitio de restricción presente en el alelo a se encuentra resaltado en verde. (b) Esquema de estrategia de genotipado por CAPS. Debajo de cada esquema de la secuencia codificante se detallan los tamaños de los fragmentos esperados luego de la digestión de amplicón con *RsaI*. En verde se indican las posiciones de los cebadores citBLCY2gen-F y citBLCY2gen-R (Tabla 8) utilizados para la amplificación por PCR. (c) Electroforesis en gel de Agarosa 1,5 % de los productos de PCR digeridos con *RsaI* para los genotipos analizados. El marcador de peso molecular utilizado es Hyperladder 50bp (Meridian Bioscience®, USA) y las bandas de mayor intensidad indican tamaños de 2000, 1000 y 300 pb.

(a)



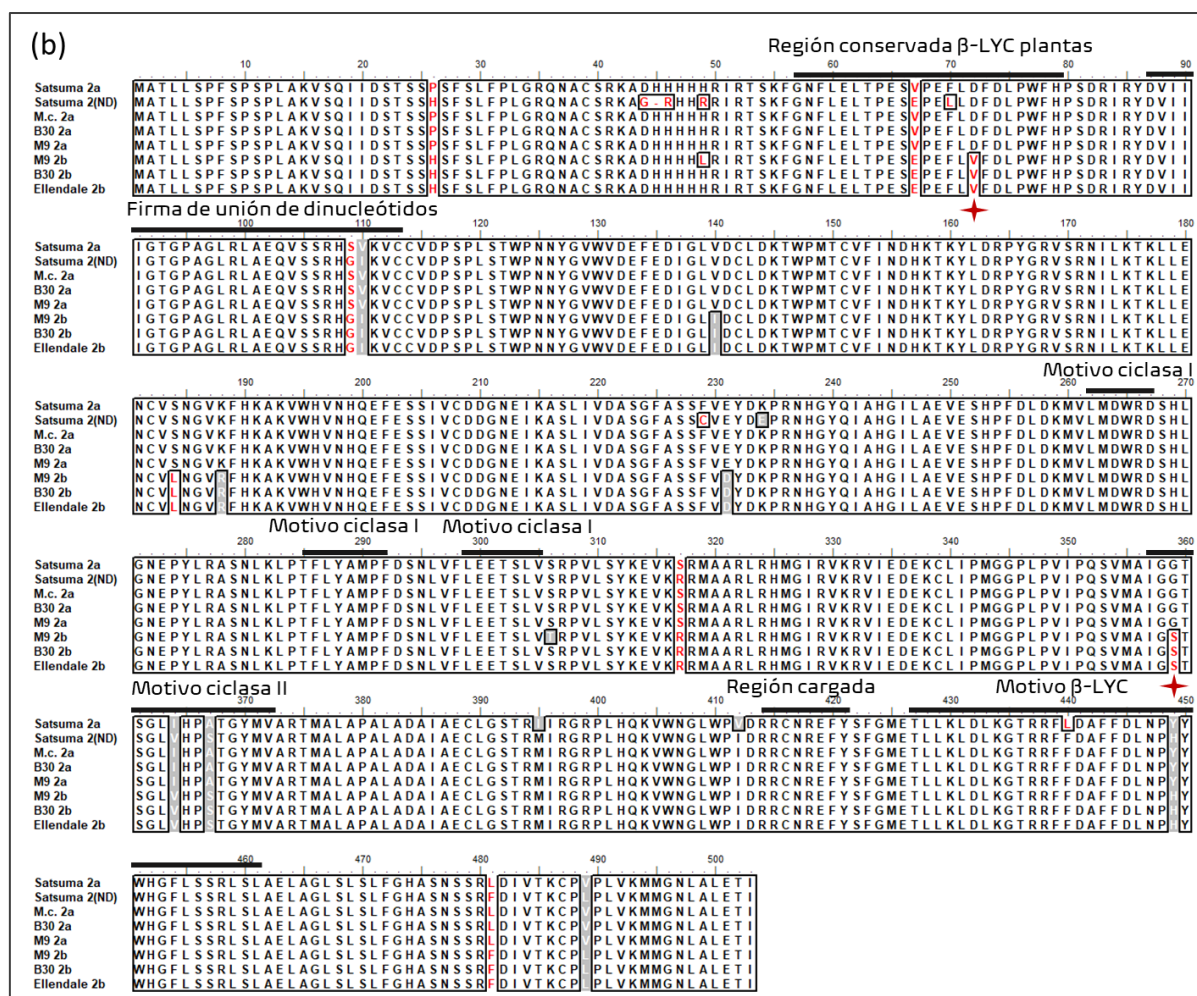


Figura 18. Alineamiento de secuencias codificantes de β LCY2. (a) Alineamiento a nivel nucleotídico para los alelos clonados y secuenciados presentes en Satsuma. El sitio de restricción de *RsaI* se encuentra subrayado con una barra negra. (b) Alineamiento de la secuencia aminoacídica de los alelos clonados y secuenciados para Satsuma, Mandarina común, B30, M9 y Ellendale. Los dominios característicos de licopeno ciclasas se indican con barras negras en la parte superior de las secuencias y los sitios críticos para la actividad licopeno ciclasa se encuentran indicados con una cruz roja en la parte inferior de las secuencias. Los aminoácidos idénticos están en letra negra, los similares están resaltados con gris y los aminoácidos diferentes están indicados con letras rojas.

Adicionalmente, en el año 3, se determinó la expresión génica de β LCY2 en pulpa para los alelos a y b de los híbridos A218, B475, B30 y M9 y de las variedades comerciales de mandarina Nova y Clementina de Nules, pomelo Marsh y Star Ruby, naranja Washington Navel y limón Lisbon. Se realizaron análisis de calidad de fruta para corroborar los estadios de madurez colectados y los valores se ajustaron a lo esperado (Tabla 11). Al igual que para el año 2, se detectó la expresión de los alelos a y b para los híbridos B30 y M9 y la del alelo b únicamente para los híbridos A218 y B475 (Figura 19a). En tanto, para las variedades comerciales, se detectó la expresión de ambos alelos en todas, excepto en limón donde solamente se detectó la expresión del alelo b (Figura 19b). En este análisis, no se observaron cambios significativos en la expresión de β LCY2a en los híbridos B30 y M9 y de β LCY2b para B30, M9, A218 y B475 en los estadios analizados (VM, CC y M). Para las variedades comerciales, sin embargo, se observaron patrones de expresión génica diferentes. En el caso de las mandarinas Clementina de Nules y Nova se observaron patrones similares para ambos alelos, con un leve aumento en la expresión en

CC que se mantiene en M. Para los pomelos, sin embargo, los patrones observados fueron diferentes, con un leve aumento en Marsh en el estadio M y un incremento paulatino de la expresión de mayor magnitud para Star Ruby en ambos alelos. En Star Ruby, además, el alelo b alcanzó valores mayores de expresión. En la naranja Washington Navel, no se observaron cambios significativos en la expresión del alelo a mientras que se observó un leve aumento de la expresión en el alelo b en el estadio M. Para el limón Lisbon, se observó un leve incremento de la expresión del alelo b en el estadio CC.

Tabla 11. Calidad de fruta al momento de la cosecha en el estadio Maduro e ICC interno y externo para los estadios de madurez Verde Maduro, Cambio de Color y Maduro de los genotipos analizados en el año 3.

	A218	B475	B30	M9	Nova	Clem.	Marsh	S. Ruby	W. Navel	Lisbon
% de jugo	35,99	54,47	40,10	29,83	48,62	40,35	41,18	49,30	47,94	32,78
Contenido de sólidos solubles	11,50	12,45	11,46	8,15	11,37	10,98	9,11	11,23	10,57	8,73
Acidez titulable	1,16	1,27	1,41	0,78	0,93	0,79	1,55	1,61	0,84	5,96
Índice de madurez (SS/Acidez)	9,90	9,83	8,12	10,41	12,22	13,94	5,87	6,98	12,55	1,46
ICC interno										
Estadio de madurez	A218	B475	B30	M9	Nova	Clem.	Marsh	S. Ruby	W. Navel	Lisbon
Verde Maduro (VM)	2,90±0,26	0,19±0,23	1,36±0,21	-0,30±0,30	-0,47±0,08	0,12±0,21	-3,67±0,14	16,09±1,06	-3,95±0,07	-5,45±0,20
Cambio de Color (CC)	4,94±0,12	3,23±0,18	3,73±0,21	3,80±0,16	1,89±0,09	2,53±0,14	-4,22±0,11	31,86±0,90	-3,28±0,13	-4,60±0,17
Maduro (M)	6,47±0,10	7,78±0,19	6,11±0,12	4,29±0,12	4,11±0,10	3,72±0,42	-4,40±0,07	29,34±0,41	-1,60±0,15	-4,64±0,54
ICC externo										
Estadio de madurez	A218	B475	B30	M9	Nova	Clem.	Marsh	S. Ruby	W. Navel	Lisbon
Verde Maduro (VM)	-11,13±0,81	-14,57±1,46	-14,29±0,40	-15,05±0,40	-14,52±0,26	-14,08±0,36	-12,39±0,56	-10,73±0,63	-15,06±0,33	-11,52±0,21
Cambio de Color (CC)	-0,93±0,47	-2,70±0,59	1,07±0,70	-0,06±0,93	-3,73±0,56	-5,45±0,47	-7,69±0,59	0,13±0,67	-8,50±0,73	-8,01±0,51
Maduro (M)	8,72±0,13	9,63±0,15	8,58±0,18	8,56±0,40	5,75±0,21	4,57±0,39	-1,21±0,08	3,83±0,25	1,69±0,24	-1,44±0,15

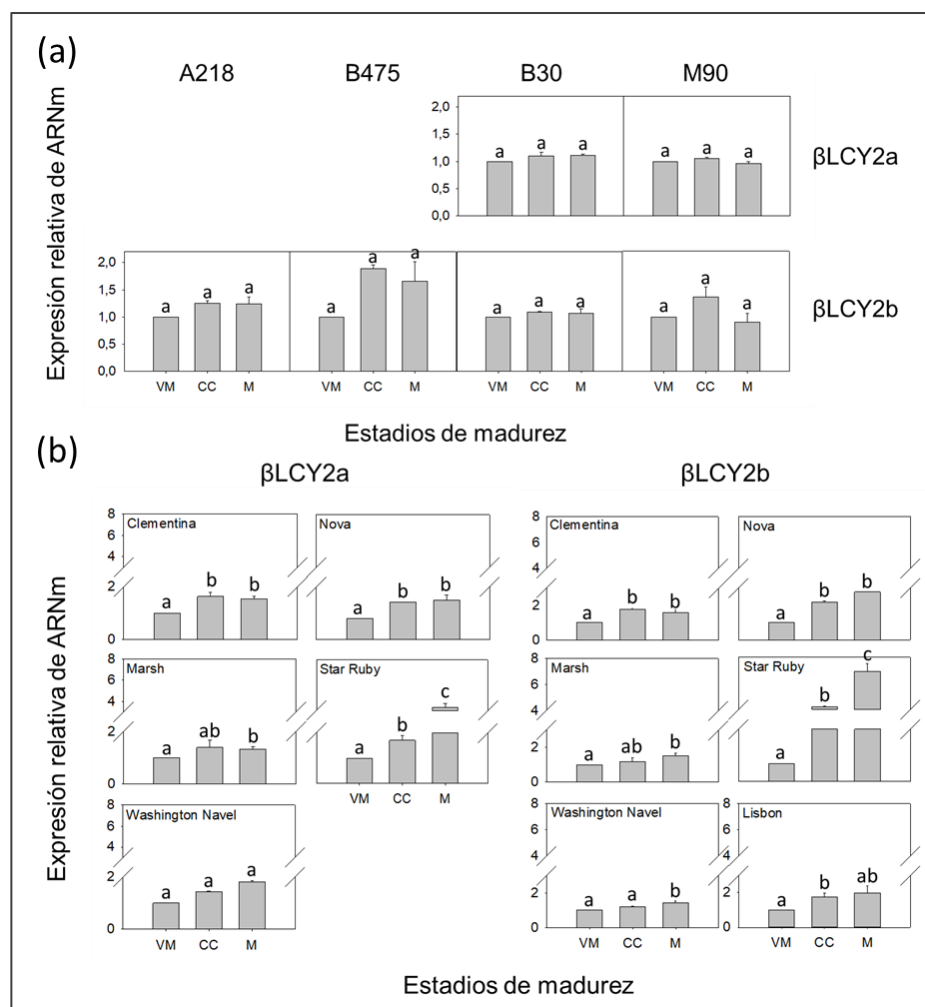


Figura 19. Expresión de los alelos a y b de β LCY2 en la pulpa durante los estadios VM, CC y M durante el año 3. (a) Expresión alelos a y b de β LCY2 en híbridos nacionales A218, B475, B30 y M9. (b) Expresión alelos a y b de β LCY2 en variedades comerciales de Mandarinas Clementina de Nules y Nova, Pomelos Marsh y Star Ruby, Naranja W. Navel y Limón Lisbon. Los cálculos de la expresión relativa se realizaron con el método de Pfaffl con relación al estadio VM de cada genotipo. Se muestran las medias $\pm$ EE. Para cada genotipo, letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Si bien al analizar la expresión por separado en cada genotipo no se encuentran grandes cambios en los niveles de expresión durante la maduración (excepto para SR), cuando comparamos los niveles de expresión entre los genotipos se observan diferencias importantes para ambos alelos (Figura 20). En este análisis se tomó como referencia, para cada alelo, la muestra de SR en el estadio VM. Como se puede observar en la Figura 20, en el caso del alelo a de β LCY2, el pomelo SR tiene los menores niveles de expresión durante los tres estadios, seguido por B30 y M9 con valores intermedios y por último las variedades de mandarinas Clementina de Nules y Nova, el pomelo Marsh y la naranja W. Navel que presentan mayores niveles de expresión en todos los estadios. Los híbridos A128, B475 y el limón Lisbon no poseen este alelo, por lo que no se detecta su expresión, como se describió anteriormente. En el caso del alelo b de β LCY2, los distintos genotipos también se pueden agrupar en 3. El primer grupo presenta niveles de expresión similares a SR, y comprende a los híbridos B30, M9, el pomelo Marsh y el limón Lisbon. El segundo grupo presenta niveles intermedios de expresión y está formado por los híbridos A218 y B475 mientras que las mandarinas Clementina de Nules y Nova y la naranja W. Navel conforman un tercer grupo con los mayores niveles de expresión para el alelo b (Figura 20). Otra

diferencia notoria es que la magnitud de los cambios es más marcada para el alelo b, con valores que alcanzan niveles de más de 300 veces mayores que los encontrados en SR VM, mientras que en el alelo a las diferencias no alcanzan a ser más de 70 veces. Finalmente, para determinar si existe un sesgo en la transcripción de los alelos a y b, se clonó el ADN copia de β LCY2 de M9 a partir de ARN purificado de pulpa en el estadio CC. Se analizaron un total de 58 colonias por PCR y digestión con *RsaI* y se determinó que el 45% corresponden al alelo a y 55% al alelo b, descartándose un sesgo transcripcional de un alelo frente a otro, al menos en el híbrido M9.

El genotipado y los análisis de expresión génica para los alelos a y b de β LCY2 sugiere que genotipos homocigotas para el alelo b son capaces de catabolizar el licopeno de manera eficiente y que en el híbrido M9, que es heterocigota, no se observa un sesgo en la transcripción de ambos alelos. En base a estas observaciones se decidió evaluar la actividad licopeno ciclasa de ambos alelos en un sistema de complementación heteróloga en bacterias carotenogénicas.

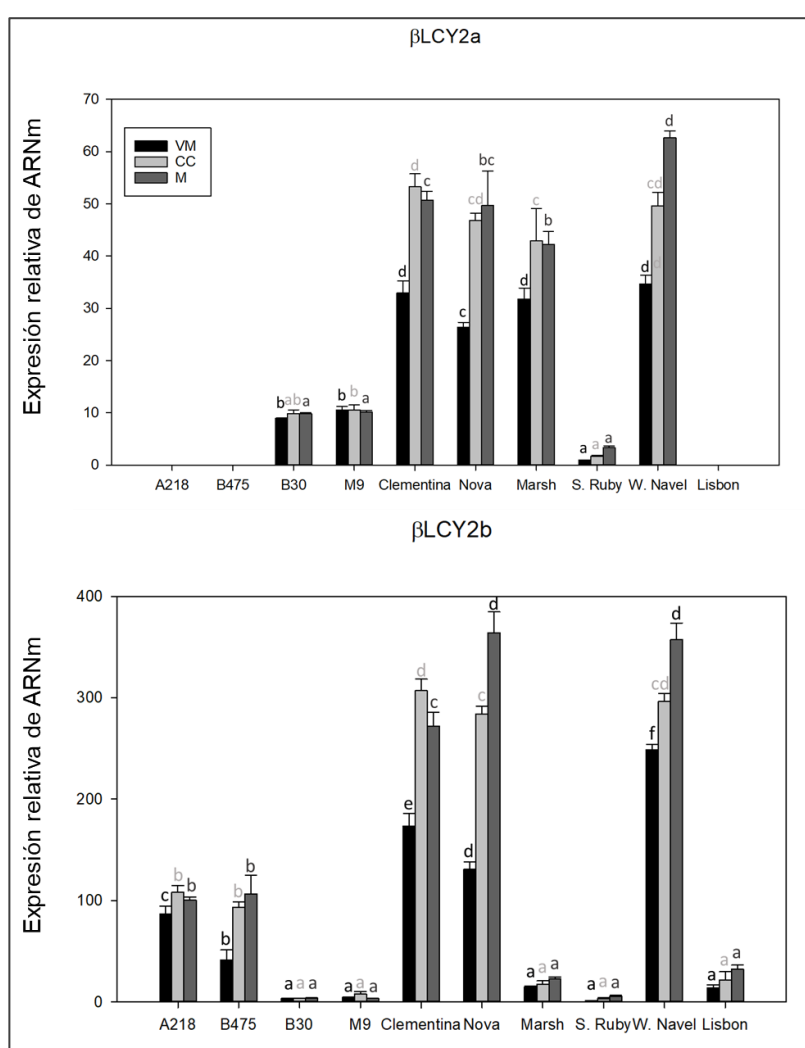


Figura 20. Comparación de los niveles de expresión génica entre genotipos para los alelos a y b de β LCY2 en referencia a los niveles de Star Ruby en el estadio VM. Los cálculos de la expresión relativa se realizaron con el método de Pfaffl. Los análisis estadísticos se realizaron para cada estadio (VM, CC y M) por separado. Se muestran las medias $\pm$ EE. Letras diferentes del mismo color indican diferencias significativas entre variedades dentro de cada estadio ($p < 0,05$).

5.4.3 Caracterización funcional de alelos a y b de β LCY2 del híbrido M9.

Para determinar los niveles de actividad de los alelos a y b presentes en los híbridos nacionales, se utilizó el genotipo M9. Se seleccionó para este análisis un genotipo heterocigota para clonar ambos alelos provenientes del mismo genotipo. Se clonaron los alelos a y b en el vector pET28a y se transformaron ambas construcciones y el vector vacío en la cepa de *E. coli* DS1B- $\Delta crtY$ (Tabla 9). Se seleccionaron 3 colonias positivas de cada transformación y se utilizaron para los ensayos de complementación. Se observó que las colonias transformadas, ya sea con el alelo a o el b, son capaces de convertir licopeno en β -caroteno ya que adquieren una coloración anaranjada muy similar a la cepa control *E. coli* DS1B. A su vez, el pico mayoritario detectado por HPLC corresponde con los tiempos de retención y el espectro de absorción del β -caroteno (Figura 21). En contraste, las colonias transformadas con el vector vacío continúan presentando color rojo (datos no mostrados). Además, las eficiencias del alelo a y b son muy similares, siendo capaces de convertir el $86,48 \pm 0,57$ % y el $89,99 \pm 1,80$ % del licopeno a β -caroteno, respectivamente (Figura 21). En todas las cepas, excepto *E. coli* DS1B- $\Delta crtY$, se observó un pequeño pico intermedio entre licopeno y β -caroteno, pero no se logró identificar el compuesto al que corresponde, ya que su espectro de absorción no era nítido debido a su baja proporción.

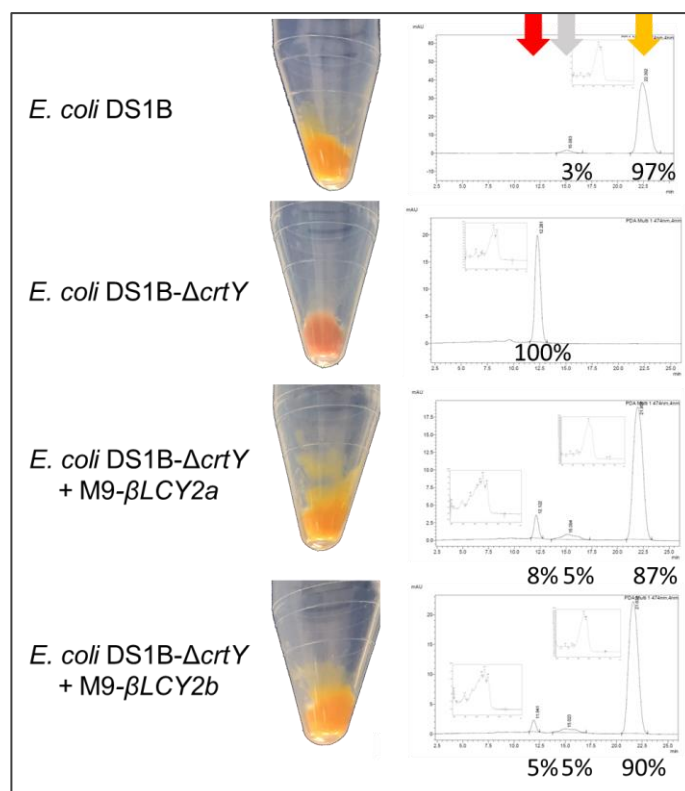


Figura 21. Complementación heteróloga. Para cada cepa bacteriana se observa el pellet del cultivo, el cromatograma de HPLC correspondiente y la proporción relativa de cada compuesto. Los espectros de absorción correspondientes a cada pico se encuentran al lado de cada uno. El pico correspondiente a β -caroteno se detecta entre los minutos 21 y 23 (flecha anaranjada) mientras que el pico correspondiente al licopeno se detecta entre los minutos 11 y 12,5 (flecha roja). La flecha gris indica la posición de un pico no identificado.

5.4.4 Generación de alelos mutantes para β LCY2 en el híbrido B30

En el genoma de los citrus se han descrito hasta el momento dos genes que codifican para enzimas con actividad licopeno β ciclasa: β LCY1 y β LCY2 (*orange1.1g014377m* y *orange1.1g010693m*, respectivamente). β LCY1 se expresa principalmente en tejidos verdes, en cambio, β LCY2 se expresa exclusivamente en el fruto y se localiza específicamente en cromoplastos, tanto en la pulpa como en el flavedo. Los dos ARN guías que se diseñaron para la secuencia de β LCY2 se posicionan a +177 (Guía 1) y +242 pb (Guía 2) del sitio ATG de forma tal que evitan zonas que presentan variantes en la secuencia para los alelos a y b (Figura 22a). Los ensayos de actividad *in vitro* demostraron que ambos ARN guías permiten editar el sitio blanco de forma eficiente, observándose una mayor eficiencia para el ARN guía2 (Figura 22b).

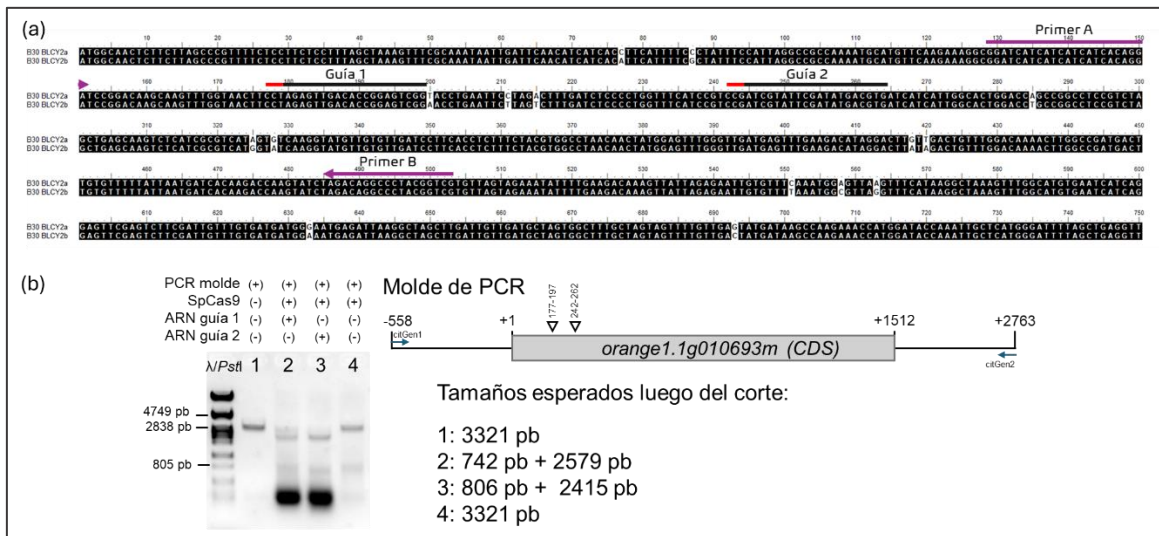


Figura 22. Diseño de ARN guías y actividad *in vitro*. (a) Alineamiento de los primeros 750 pb de las secuencias genómicas de B30 para los alelos a y b de β LCY2. Se indican las posiciones de los dos ARN guías diseñados, ARN guía1 (Guía 1) (+177-197) y ARN guía2 (Guía 2) (+242-262) y de los cebadores A (β LCY2ed-fwd) y B (β LCY2ed-rev) utilizados para el genotipado. (b) Actividad *in vitro* de los ARN guías Guía 1 y Guía 2. Gel de agarosa con el producto de digestión del PCR de ADN genómico que contiene los sitios blanco y esquema del gen y los tamaños esperados luego del corte con cada complejo Cas9/ARN guía1 y Cas9/ARN guía2.

Las secuencias correspondientes a los dos ARN guías se clonaron en el vector binario pDIRECT22C que contiene el *cassette* para la expresión de la Cas9, un *cassette* para la expresión policistónica de ambos ARN guías y un *cassette* de selección. Este vector fue transformado en callos embrionarios del genotipo B30 utilizando *A. tumefaciens* EHA105.

Se obtuvieron dos líneas de callos resistentes a la kanamicina que se multiplicaron para luego incubarse en medio de regeneración hasta obtener brotes (Figura 23 a, b, c y d). Se extrajo ADN de restos de callos en vías de regeneración repicados de 5 frascos diferentes para cada línea y se detectó la presencia del transgén en todos los casos (Figura 24a). Se utilizaron 3 extracciones de ADNs (pools) de cada línea para realizar análisis de HRM donde se observaron diferencias en las curvas de desnaturalización (melting) de los amplicones de las tres muestras provenientes de la línea ST_BM (Figura 24b), mientras que las curvas provenientes de la línea 1M fueron dudosas (resultados no mostrados). Posteriormente, se amplificó la región que contiene ambos sitios blanco con los cebadores β LCY2ed-fwd (cebador A) y β LCY2ed-rev (cebador B) para secuenciación por Sanger y estos resultados

se compararon con los resultados de HRM. Mediante la secuenciación por Sanger se logró identificar que las 3 muestras analizadas provenientes de la línea ST_BM poseen ediciones en el sitio correspondiente al ARN guía1 (Figura 24c), mientras que el sitio del ARN guía2 no presentó mutaciones y las secuencias permanecieron iguales al alelo salvaje. Como los cromatogramas obtenidos en la secuenciación Sanger provienen de un pool de al menos 5 plantas, las secuencias obtenidas son una mezcla de varios alelos presentes. Para predecir los alelos presentes en cada muestra, se utilizó el software de deconvolución ICE de Synthego (<https://ice.synthego.com/#/>). Este software predijo la presencia de 3 alelos con delecciones de 9 nucleótidos (Δ 9a, b y c) y dos alelos con una inserción de 1 nucleótido (Figura 25a). Al traducir las secuencias codificantes resultantes vemos que para las delecciones de 9 nucleótidos se generan proteínas que carecen de 3 aminoácidos (Asparagina, Fenilalanina y Leucina en las posiciones 58, 59 y 60, respectivamente) y, además, presentan algunos aminoácidos diferentes. El alelo Δ 9a, tiene 3 aminoácidos diferentes, una asparagina en la posición 61, una fenilalanina en la 62 y una prolina en la posición 63 (E61N; L62F y T63P); el alelo Δ 9b sustituye el aminoácido glutamato por lisina en la posición 61 (E61K) y el alelo Δ 9c presenta una Asparagina en la posición 61 (E61N). Luego de estos cambios, los tres alelos recuperan la secuencia de la proteína original. Sin embargo, estas delecciones y sustituciones de aminoácidos se encuentran dentro de la región conservada licopeno β ciclasa de plantas, lo que podría generar alelos inactivos o con menor eficiencia que los alelos salvajes. El alelo que presenta la inserción de un nucleótido cambia completamente el marco de lectura de las proteínas, generando polipéptidos con codones de terminación prematuros en medio de la región conservada licopeno β ciclasa de plantas (Figura 25b).

Para el llevar a cabo el análisis individual de las plantas regeneradas y determinar los alelos específicos presentes en estas plantas, los brotes editados que regeneraron a partir de ambas líneas transformadas fueron injertados *in vitro* sobre *Poncirus trifoliata* (Figura 23 f, g y h). Las líneas regeneradas que presenten ediciones serán sobreinjertadas en limón rugoso para su aclimatación y se mantendrán en el invernadero de bioseguridad hasta que produzcan frutos y puedan ser fenotipadas.

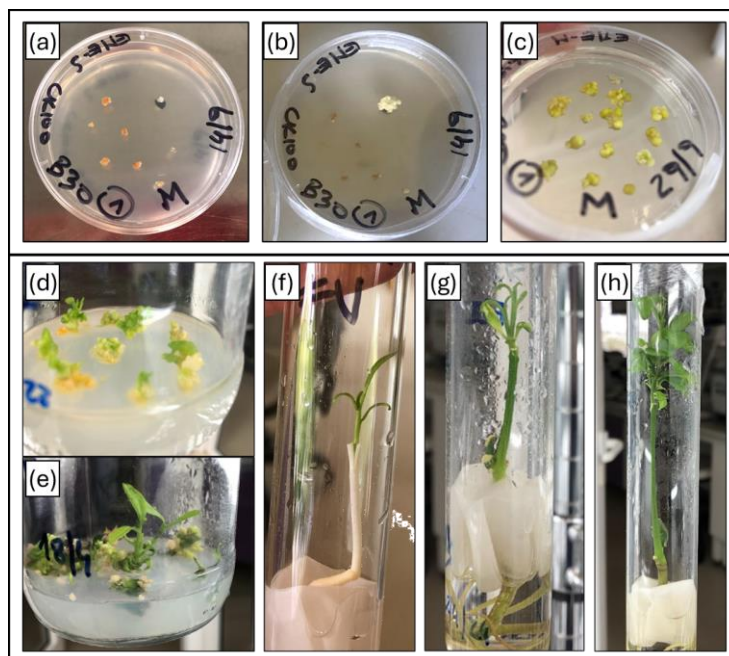


Figura 23. Proceso de regeneración de plantas a partir de callos transformados. (a) y (b): proliferación de un callo resistente a kanamicina. (c) embriones regenerados a partir de callo. (d) y (e): generación de brotes. (f), (g) y (h): injerto *in vitro* de brotes sobre *P. trifoliata*.

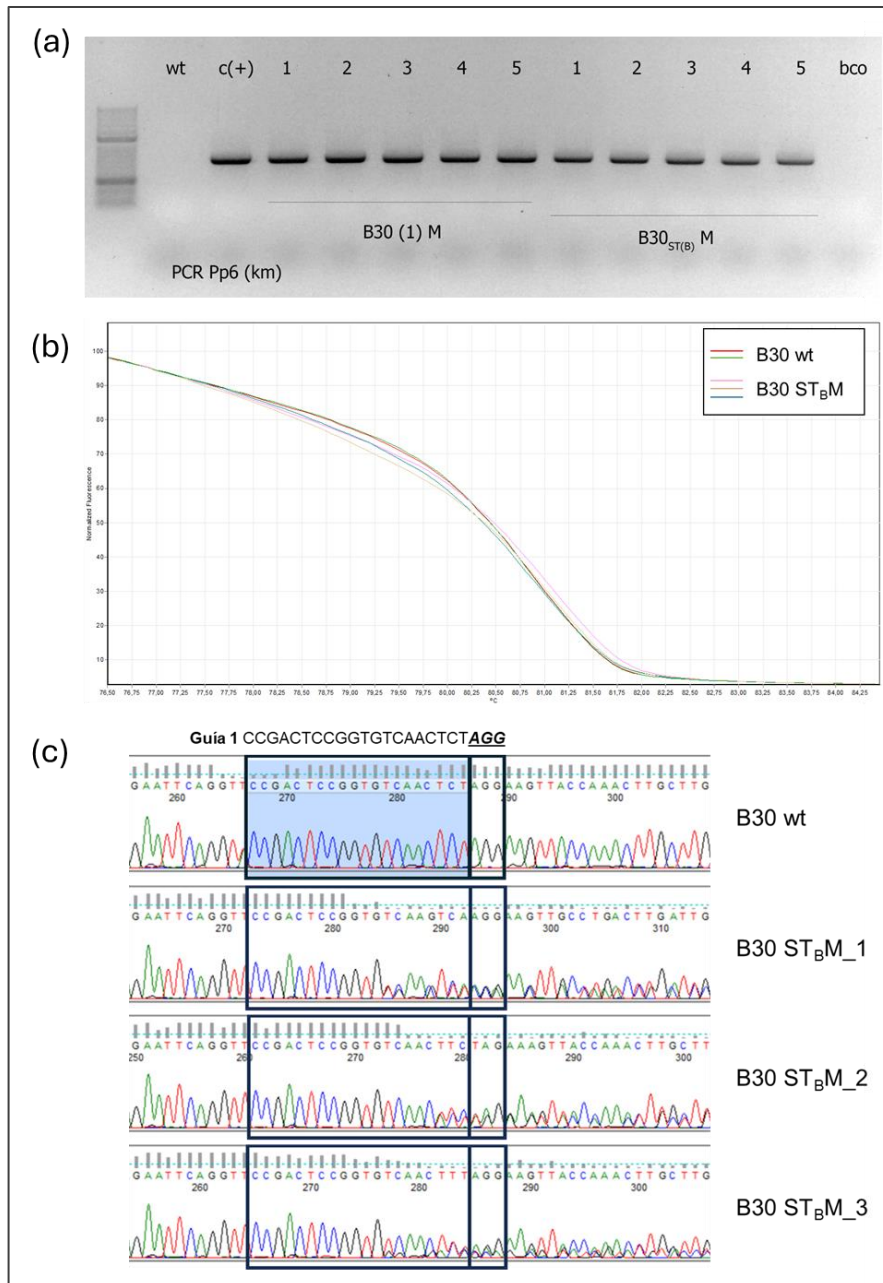


Figura 24. Genotipado de las líneas de callos resistentes a kanamicina del híbrido B30. (a) PCR con cebadores Pp6-fwd y Pp6-rev que amplifican la región correspondiente al gen *nptII* del T-DNA. (b) Curvas de HRM correspondientes a productos de PCR de B30 wt y de B30 ST_BM provenientes de 3 muestras de ADN compuestas. (c) cromatogramas Sanger de la región que contiene el sitio de corte asociado al Guía 1 para B30 wt y tres pools de B30 ST_BM.

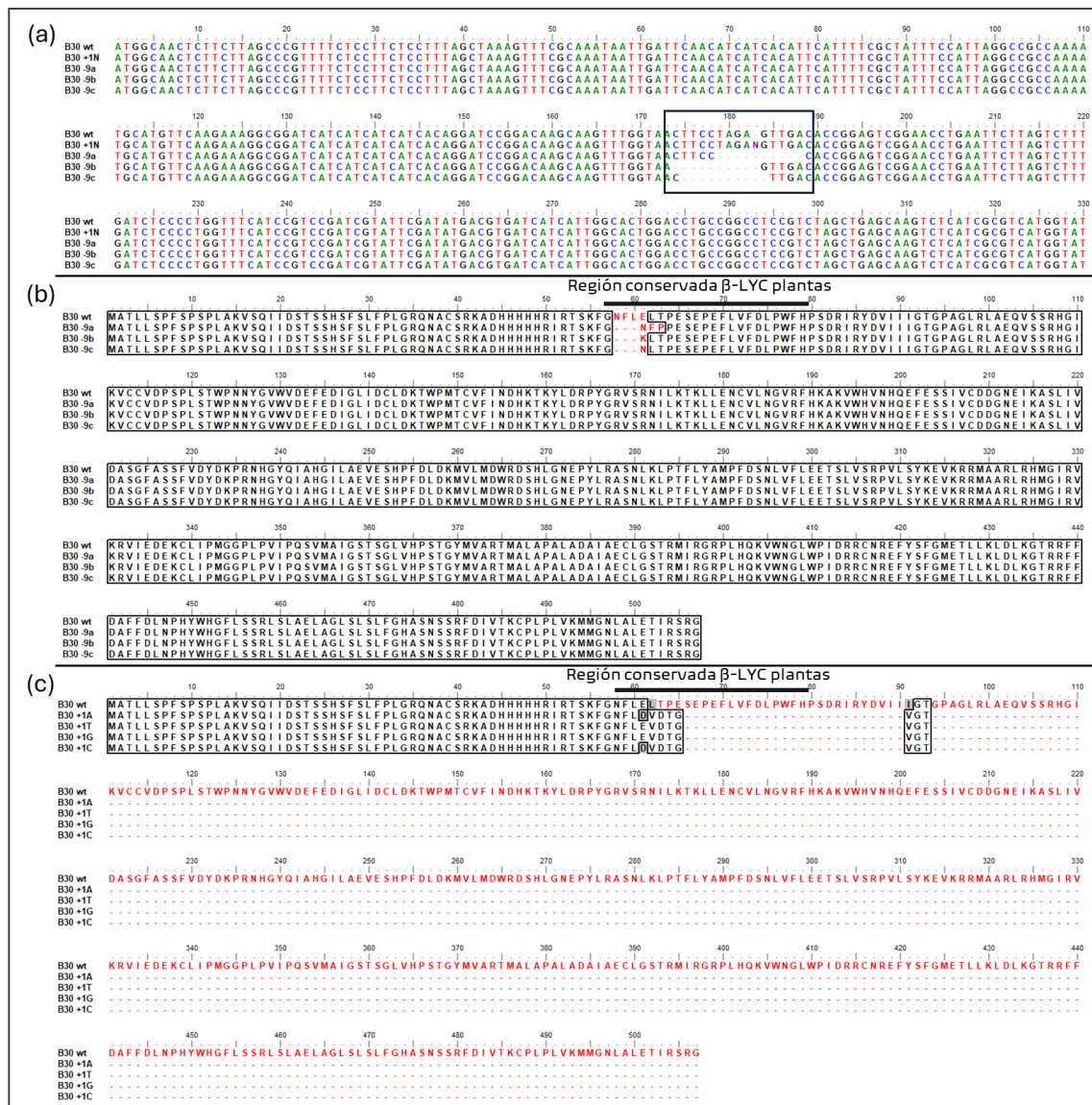


Figura 25. Predicción de alelos mutantes en B30. (a) Alineamiento de los primeros 330 nucleótidos de las secuencias de B30 wt y las secuencias con las mutaciones predichas por el software ICE de Synthego (<https://ice.synthego.com/#/>). La región con las mutaciones predichas se resalta con un rectángulo negro. (b) Alineamiento de secuencias de aminoácidos para la proteína de B30 wt y de los 3 alelos predichos con deleciones de 9 nucleótidos ($\Delta 9a$, b y c). (c) Alineamiento de secuencias de aminoácidos para la proteína de B30 wt y de los 4 posibles alelos predichos con la inserción de 1 nucleótido (+1A, +1T, +1G y +1C). En (b) y (c) los aminoácidos idénticos se muestran con letras negras y los diferentes con letras rojas. La región conservada β LCY de plantas se indica con una barra negra.

5.5 Discusión y conclusiones

En este trabajo se caracterizó la acumulación de carotenoides totales de 4 híbridos nacionales de mandarinas del programa de mejoramiento genético, y se estudió la relación entre los niveles de carotenoides con la expresión durante el desarrollo y maduración del fruto, de los genes que codifican para enzimas clave de la ruta de biosíntesis de estos compuestos. Adicionalmente se analizaron los alelos presentes de la enzima β LCY2 y se caracterizó su perfil de expresión en los híbridos y en variedades comerciales. Se determinó la eficiencia de ambos alelos en un sistema de complementación

heteróloga en bacterias y finalmente se editó el gen que codifica para la β LCY2 en el híbrido B30, logrando así obtener, por primera vez, plantas de mandarina editadas, completamente regeneradas.

El contenido de carotenoides totales cuantificado en la pulpa de los frutos maduros para los híbridos estudiados y sus parentales fue acorde a los valores reportados por otros trabajos para mandarinas y sus híbridos. Para Satsuma (*C. unshiu*), se describen valores entre 15 y 34 $\mu\text{g/g}$ PF en la pulpa de frutos maduros (Alquézar et al., 2008; Wang et al., 2011; Moltini et al., 2018), lo que se asemeja a los resultados observados en este trabajo. Para Mandarina Común (*C. reticulata*), los valores determinados en este trabajo se encuentran en el rango de los valores reportados en la bibliografía, que varían entre 5 y 30 $\mu\text{g/g}$ PF (Canan et al., 2016; Moltini et al., 2018). En el caso del híbrido Ellendale los valores obtenidos son mayores a los descritos en la bibliografía (25 $\mu\text{g/g}$ PF) (Moltini et al., 2018). En los híbridos analizados (A218, B475, B30 y M9) se determinaron valores similares a los encontrados en la bibliografía (30 $\mu\text{g/g}$ PF A218, 25 $\mu\text{g/g}$ PF B475, 30 $\mu\text{g/g}$ PF B30 y 25 $\mu\text{g/g}$ PF M9) (Moltini et al., 2018) y también similares a los de otros híbridos complejos como Hansen (39.4 $\mu\text{g/g}$ PF) pero menores a valores observados para Nadorcott (46.9 $\mu\text{g/g}$ PF) o Murcott (44.9 $\mu\text{g/g}$ PF) (Alquézar et al., 2008; Zacarías-García et al., 2020).

De manera similar a lo descrito para otros cítricos (Kato, 2012), este trabajo mostró que, en mandarina, la expresión de genes clave de la ruta de síntesis de carotenoides aumenta a medida que progresa el desarrollo y la maduración de los frutos de los genotipos estudiados. *PSY* presentó una inducción más marcada para A218, B30 y M9 y luego un descenso en la madurez (Figura 16). Estos resultados son similares a los reportados para la mandarina Satsuma, y en algunos tangores e híbridos complejos de mandarinas (como Tamami, Wilking y, Kiyomi), que mostraron una fuerte inducción de *PSY* en la pulpa a medida que el fruto maduraba, seguida de un descenso en su expresión (Kato et al., 2004; Kato et al., 2007; Kato, 2012). En otros cítricos como naranjas, pomelos y toronjas, también se ha descrito una inducción de *PSY* que acompaña el proceso de maduración del fruto y luego se mantiene constante o desciende. En varios de estos casos, los niveles de inducción de *PSY* son mayores en aquellas variedades que acumulan licopeno (Liu et al., 2007; Alquezar et al., 2008; Fanciullino et al., 2008; Alquezar et al., 2013; Peng et al., 2013; Liu et al., 2016; Yan et al., 2018; Zacarías-García et al., 2022), lo que resalta el rol de la regulación de la expresión del gen en la acumulación de estos carotenoides.

En los híbridos A218, B475, B30 y M9, la expresión de β LCY2 se comporta de modo similar a lo descrito para mandarinas y otros cítricos, con un aumento en la expresión a medida que avanza la maduración del fruto, especialmente en el estadio de cambio de color (Alquezar et al., 2009; Mendes et al., 2011; Zhang et al., 2012a; Alquezar et al., 2013; Zacarías-García et al., 2022). Sin embargo, en los híbridos A218 y B475 sólo se detectó la expresión del alelo b, mientras que la expresión del alelo a permaneció por debajo del umbral de detección (Figuras 16 y 19). Lo anterior concuerda con los resultados del genotipado para los alelos a y b, donde se observó que estos híbridos (al igual que su parental Ellendale) presentan únicamente el alelo b para β LCY2 (Figura 17). En trabajos previos se reportó que el alelo b de β LCY2 tiene actividad licopeno ciclasa casi nula (Alquezar et al., 2009; Lu et al., 2016b). Sin embargo, los híbridos A218 y B475 tienen la ruta de catabolismo de licopeno activa, acumulando carotenoides en niveles similares a otras mandarinas y su color interno y los patrones de expresión de β CHX (Figura 16) concuerdan con la acumulación de β -criptoxantina y otras xantofilas, sin presentar los tintes rojizos característicos de la acumulación de licopeno (Kato et al., 2007). Contrariamente a lo reportado por Alquezar et al. (2009) y Lu et al. (2016), el alelo b presente en los híbridos nacionales, específicamente en M9, se transcribe en las mismas proporciones que el alelo a y muestra una actividad licopeno ciclasa eficiente, siendo capaz de convertir el 89,9% del licopeno en β -caroteno en los ensayos de complementación en bacterias (mientras que el alelo a convierte el 86,5% del licopeno en β -caroteno) (Figura 21). Si bien este resultado contradice algunos trabajos previos, Zhang et al.

(2012) reportan la presencia de un alelo de β LCY2 en naranja Valencia, con una secuencia aminoacídica que concuerda con la del alelo b. En ese trabajo se observa que el alelo de Valencia, al igual que el alelo b presente en los híbridos nacionales, es capaz de convertir un alto porcentaje del licopeno en β -caroteno en ensayos de complementación *in vivo* en *E. coli* (Zhang et al., 2012a).

Cuando comparamos los niveles de expresión de β LCY2 entre los diferentes híbridos y variedades comerciales, a grandes rasgos se diferenciaron tres grupos (Figura 20): por un lado, Star Ruby con los niveles menores para β LCY2a seguido de B30 y M9 con niveles intermedios de expresión y luego Clementina de Nules, Nova, Marsh y W. Navel con los mayores niveles para este alelo. Por otro lado, para β LCY2b, se agruparon Star Ruby, B30, M9, Marsh y Lisbon con los menores niveles de expresión, A218 y B475 con niveles intermedios y por último Clementina de Nules, Nova y W. Navel con los mayores niveles de expresión. En el caso de los pomelos Star Ruby y Marsh, se ha observado que β LCY2 es el único gen de la biosíntesis de carotenoides y de las rutas de biosíntesis de sus precursores que presenta patrones de expresión diferentes entre genotipos, con niveles menores de expresión en Star Ruby que en Marsh y que esto explica la acumulación de licopeno en el primero (Alquezar et al., 2013). Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con niveles menores de expresión de este gen, especialmente para el alelo a en el caso de Star Ruby, lo que apoya, en parte, la hipótesis que plantea el trabajo de Alquézar *et al.* (2013). Sin embargo, la ausencia del alelo a en A218, B475, Ellendale y Lisbon y los niveles de actividad enzimática similares para los alelos a y b de M9 en ensayos de complementación heteróloga en *E. coli*, disienten con la hipótesis planteada por Alquezar *et al.* (2013) y Lu *et al.* (2016b), de que la baja actividad del alelo b contribuya a la acumulación de licopeno, ya que ninguno de los genotipos analizados que solamente tienen el alelo b presenta acumulación de licopeno en el fruto y, por ende, el catabolismo de licopeno se encuentra activo.

Estos resultados, en conjunto con los reportados en la literatura, apoyan la existencia de mecanismos de regulación adicionales a los transcripcionales, que estarían participando en la acumulación de carotenoides en cítricos. Si bien los patrones de expresión de los genes codificantes de las enzimas clave para la biosíntesis de carotenoides tienen relación directa con el progreso de la acumulación de estos pigmentos durante el desarrollo y maduración del fruto, no siempre una mayor expresión se condice con un incremento de la biosíntesis y viceversa. Esto se evidencia en la existencia de mecanismos de regulación a nivel post transcripcional y postraducciona. Por ejemplo, en varias especies vegetales se han descrito mecanismos de regulación postranscripcional para *PSY1*, lo que afecta las variantes de la proteína que finalmente se traduce, la velocidad con que lo hace o la vida media de ésta (Howitt et al., 2009; Álvarez et al., 2016; Welsch et al., 2018; Ahrazem et al., 2019; Chen et al., 2019; Wang et al., 2020; Iglesias-Sanchez et al., 2023; Lu et al., 2024). Además, los niveles de expresión de estas enzimas están regulados no solo por factores involucrados en el desarrollo, sino también por factores que responden a estímulos ambientales (Ma et al., 2023; Lu et al., 2024).

De la expresión de genes de la ruta de síntesis de carotenoides y el genotipado de los alelos a y b de β LCY2 se evidencia que existen variedades que solamente poseen el alelo b (Figuras 16 y 17), que de acuerdo a trabajos previos es muy poco eficiente en la conversión de licopeno a β -caroteno (Alquezar et al., 2009; Alquezar et al., 2013; Lu et al., 2016b). Sin embargo, la ausencia de color rojo en estos genotipos sugiere que el alelo b presente en A218, B475 y Ellendale es capaz de catabolizar el licopeno formado en los frutos, que tienen el color característico asociado a la acumulación de β -criptoxantina. Esto es apoyado con los resultados de complementación heteróloga obtenidos en este trabajo para los alelos a y b de β LCY2 de M9, corroborando que el alelo b presente en los híbridos de mandarinas es eficiente, lo que sugiere que la presencia del alelo b no es una condición que favorezca la acumulación de licopeno como se propuso en trabajos previos (Alquezar et al., 2009; Alquezar et al., 2013; Lu et al., 2016b). En ese sentido, la comparación de los niveles de expresión de ambos alelos (a

y b) de SR con otras variedades, sugiere que sus menores niveles de expresión en comparación con otros genotipos, especialmente para el alelo a, sumado a otros mecanismos como la disponibilidad de estructuras apropiadas para la acumulación de licopeno (Lado et al., 2015a) podría contribuir a dicha acumulación, independientemente de la eficiencia de los alelos presentes de β LCY2.

En mandarinas no se conocen mutantes que acumulen licopeno como ocurre en otras especies de cítricos. Uno de los objetivos de esta tesis fue generar mutaciones de pérdida de función en ambos alelos de la β LCY2 con el fin de favorecer la acumulación de este compuesto en frutos de mandarina. Para los trabajos de edición se seleccionó al genotipo B30 por ser el que presentó mayor capacidad de acumular carotenoides (Figura 15) y por la capacidad de generar callos embriogénicos, lo que facilita la etapa de transformación genética. En este trabajo se logró la edición del gen que codifica para β LCY2 por primera vez en mandarinas y la regeneración de las plantas editadas. Recientemente se generaron mutantes por edición génica para β LCY2 en naranjas sanguíneas y el portainjerto citrange “Carrizo” (Salonia et al., 2022), así como la edición transitoria del gen *CsPDS* mediante expresión del sistema CRISPR-Cas9 en hojas de mandarina Kinnow (Manchanda et al., 2023). La transformación mediada por *Agrobacterium* utilizando explantes provenientes de plántulas (epicótilos) y posterior regeneración en mandarinas y sus híbridos ha demostrado ser muy poco eficiente (Dutt et al., 2018; Poles et al., 2020; Salonia et al., 2020). Sin embargo, la transformación de células provenientes de callos embriogénicos es una alternativa relativamente eficiente para genotipos capaces de producir este tipo de tejido (Omar et al., 2016). Además, tiene como ventaja que los embriones que regeneran provienen de una única célula, lo que evita la formación de quimeras (Poles et al., 2020).

Se obtuvieron dos líneas de callos embriogénicos de B30 resistentes a la kanamicina que proliferaron y lograron regenerar brotes transgénicos (Figura 23). Si bien en la bibliografía se reportan eficiencias de transformación que rondan el 30% para el tangor “W. Murcott” o la mandarina “Shatangju” utilizando esta metodología, utilizan hygromicina y BASTA como agentes de selección, ya que los resultados obtenidos con kanamicina como agente selectivo varían mucho en cuanto a su eficiencia (Dutt and Grosser, 2010; Dutt et al., 2018). De las dos líneas de callos que proliferaron y regeneraron, solamente en una de ellas se detectó la presencia de mutaciones. Las mutaciones se generaron en el sitio blanco correspondiente al ARN guía1 (Figura 24c). Debido al prolongado tiempo de regeneración de plantas *in vitro*, el genotipado se realizó utilizando tres pools de restos de 5 plantas al momento del repique. Se observaron evidencias de edición en la secuencia de los 3 amplicones analizados. Utilizando el software ICE de deconvolución (Synthego) se predijeron tres alelos diferentes con deleciones de 9 pb y un alelo de inserción de una base (Figura 25a). La inserción de 1 pb genera proteínas truncas (Figura 25c), por lo que esperaríamos proteínas no funcionales. Por otra parte, los alelos que tienen deleciones de 9 pb sufren alteraciones en la secuencia aminoacídica, pero se lograría traducir la proteína completa, aunque al estar en la región conservada β -LCY de plantas (Figura 25b), las proteínas resultantes podrían presentar menor eficiencia en la actividad licopeno β ciclasa. En trabajos previos realizados por Lu *et al.* (2016b) se analizaron residuos aminoacídicos críticos para la función de esta enzima. Los aminoácidos que se estudiaron en ese trabajo no se encontraban en la región donde se obtuvieron los cambios de aminoácidos en este trabajo, por lo que resta dilucidar el efecto que puedan tener en la actividad licopeno ciclasa de la enzima mutante. Las plantas regeneradas obtenidas de la línea portadora de ediciones sobreinjertaron en limón rugoso para su aclimatación *ex vitro*. Debido a que los tiempos que requiere la transformación y regeneración de plantas completas exceden los plazos de este trabajo de tesis, no se incluyen datos de la caracterización genotípica o fenotípica de las plantas obtenidas. Para ello, las plantas que sobrevivan la aclimatación serán analizadas individualmente para determinar la presencia de mutaciones en el locus β LCY2 mediante HRFA y posteriormente mediante secuenciación. Los diferentes alelos

encontrados que codifican proteínas con cambios a nivel de aminoácidos serán clonados y sometidos a ensayos de complementación heteróloga para determinar si presentan actividad licopeno β ciclasa. Solamente se mantendrán las plantas cuyos alelos editados tengan una actividad reducida o nula para evaluar el fenotipo una vez que éstas florezcan y fructifiquen.

En conclusión, en este trabajo se caracterizó la expresión de enzimas involucradas en la biosíntesis de carotenoides para 4 híbridos de mandarinas pertenecientes al programa de mejoramiento genético de Citrus de INIA, así como la acumulación de carotenoides totales de éstos a lo largo del período de desarrollo y maduración del fruto, en dos años consecutivos. Asimismo, se observó que dos de estos híbridos, uno de sus parentales (Ellendale) y el limón Lisbon, solamente poseen el alelo b de la enzima β LCY2 y que ésta, al contrario de lo expuesto en algunos trabajos previos, tiene una actividad enzimática eficiente que posibilita el catabolismo del licopeno sin oficiar como paso limitante. Además, en este trabajo obtuvimos, por primera vez, plantas regeneradas en fase de aclimatación de híbridos de mandarinas presentando alelos de β LCY2 editados. Las plantas aclimatadas que contengan alelos editados confirmados serán mantenidas para su fenotipado una vez que florezcan y fructifiquen.

6. DISCUSION GENERAL

En este trabajo se han abordado diferentes estrategias para mejorar la calidad del fruto en tomate y mandarinas, en relación con la acumulación de carotenoides, específicamente licopeno. Además, se han estudiado los mecanismos de acumulación de carotenoides en tomate y mandarinas explorando la función de nuevos genes en tomate y caracterizando germoplasma local en mandarinas.

A su vez, se logró implementar la edición génica en dos especies vegetales de hábitos diferentes, una especie autógama no leñosa como el tomate y una especie alógama leñosa como las mandarinas. Son las primeras plantas editadas reportadas en nuestro país y, además, en el caso de mandarinas, las primeras a nivel mundial.

Para tomate se utilizaron dos abordajes diferentes para promover la mayor acumulación de carotenoides en frutos. Por un lado, se desarrollaron marcadores moleculares para la introgresión de un gen de interés que deberán ser validados en caso de implementarse esta herramienta y, por otro lado, se generaron dos líneas elite editadas mediante CRISPR-Cas9, conteniendo una combinación genética novedosa que no había sido posible obtener mediante mejoramiento genético clásico. Estas líneas mostraron ventajas en cuanto a calidad de fruta y su conservación en frío, y podrán ser incorporadas al programa de mejoramiento genético cuando sean debidamente autorizadas. En el caso de mandarinas, se implementó la edición génica mediante CRISPR-Cas9 y se regeneraron plantas de mandarinas editadas por primera vez en esta especie. Asimismo, se comprobó la eficiencia del alelo b de la enzima β LCY2 presente en híbridos nacionales, aportando al conocimiento básico en el campo de la biosíntesis de carotenoides en cítricos.

La edición génica, específicamente la tecnología CRISPR-Cas9, es una herramienta muy valiosa para generar variantes genéticas novedosas que son difíciles de obtener a través de otros abordajes (Rani et al., 2016). Esta tecnología presenta la ventaja de que el sistema actúa en trans sobre el sitio del genoma donde se genera la mutación. Por lo tanto, en plantas de propagación sexual, es posible obtener plantas editadas que no presenten la construcción génica conteniendo los *cassettes* de expresión de Cas9 y ARN guías, ya sea mediante la posterior eliminación del transgén, o porque directamente este *cassette* no se insertó en el genoma o se utilizó un sistema libre de ADN en forma de partícula ribonucleoproteica (Zaman et al., 2023).

En tomate se logró implementar exitosamente la herramienta CRISPR-Cas9 para generar germoplasma novedoso, libre de ADN foráneo, en dos líneas elite avanzadas (LT16 y LT46) del programa de mejoramiento genético (Arruabarrena et al., 2023; Arruabarrena and Vidal, 2025). Ambas líneas se incorporarán rápidamente al programa, una vez aprobadas por las autoridades competentes como variedades convencionales no OGM (Sección 1.2.2a). Estas líneas editadas contienen una nueva combinación genética que incluye el hábito de crecimiento indeterminado junto con una proteína CYC-B no funcional. Como consecuencia, se obtuvieron tomates de mesa con frutos con mayor contenido de licopeno y con una maduración poscosecha más rápida y homogénea. Adicionalmente, la línea LT16-*cycb*Δ7 presentó frutos con mayor tolerancia al daño por frío durante el almacenamiento a 5 °C por 12-13 días en comparación con su isolínea no editada (Arruabarrena et al., 2023). La generación de isolíneas que solamente difieren en la mutación que genera una proteína CYC-B no funcional y la observación de una tolerancia diferencial al daño por frío entre isolíneas, sugiere fuertemente que esta tolerancia está asociada con la mayor y más temprana acumulación de licopeno en los frutos provenientes de plantas editadas. Esta tolerancia también se asocia a una menor peroxidación lipídica en la epidermis de los frutos (Figura 8), que podría reflejar una mayor protección frente al estrés oxidativo, ya sea por la acción antioxidante directa del licopeno o por la activación más temprana del sistema antioxidante del fruto.

Si bien la caracterización fenotípica de la línea editada de LT46-*cycb*Δ2 está en proceso, se combinaron ambas líneas mutantes para generar el homólogo editado del híbrido comercial INIA Frontera, observándose en sus frutos el fenotipo esperado: un desarrollo de color más temprano y uniforme y una maduración poscosecha más rápida y homogénea comparación con el híbrido no editado.

En segundo lugar, se profundizó en la caracterización de los genes ortólogos para una enzima clave en la biosíntesis de carotenoides en tomate (PSY), específicamente en los loci *Solyc03g031860* (que codifica para PSY1) y *Solyc08g007440* (de función desconocida, posible PSY4), en tomate cultivado (*S. lycopersicum* cv. M82) y la especie *S. pimpinellifolium* LA1589. Los resultados mostraron que el gen *PSY1* se expresa aproximadamente mil veces más en el fruto de *S. pimpinellifolium* LA1589 en comparación con *S. lycopersicum* cv. M82 (Figura 10a), mientras que el gen *Solyc08g007440* (PSY4) se expresa aproximadamente 10 veces más en *S. pimpinellifolium* LA1589 (Figura 10c). Sin embargo, el gen *Solyc08g007440* carece de actividad fitoenosintasa (Figura 12), resultado que concuerda con el análisis bioinformático de la secuencia aminoacídica de este gen (Figura 11b), donde no se identificaron las regiones conservadas características de las fitoenosintasas de plantas. En consecuencia, la función del gen *Solyc08g007440* continúa siendo desconocida.

Una de las estrategias frecuentemente utilizadas por los programas de mejoramiento genético es la introgresión de genes de interés provenientes de especies silvestres emparentadas (Barillas et al., 2008; Foolad and Panthee, 2012). En ese sentido, se diseñaron marcadores moleculares para detectar el alelo del gen *PSY1* presente en *S. pimpinellifolium* LA1589 con el fin de introgresarlo en tomate cultivado de manera eficiente. Sin embargo, el germoplasma utilizado de LA1589 resultó ser heterocigota para el marcador diseñado (Figura 13), por lo que no se avanzó con los cruzamientos y validación de la presencia del gen y el fenotipo buscado.

En mandarina se caracterizó la biosíntesis y acumulación de carotenoides en 4 híbridos nacionales de interés (A218, B475, B30 y M9); se exploraron los diferentes patrones de expresión génica de las principales enzimas involucradas en esta ruta metabólica durante la maduración del fruto (Figura 15b) y se observó una similitud, a grandes rasgos, con el proceso descrito en otros cítricos (Kato et al., 2004; Kato et al., 2007; Kato, 2012). En los híbridos de mandarina estudiados, el alelo b de la β LCY2 es capaz

de convertir el licopeno en β -caroteno de manera eficiente (similar al alelo a; Figura 19), lo que concuerda con información presentada en el trabajo de Zhang *et al.* (2012) en naranja Valencia. Sin embargo, trabajos desarrollados en naranjas rojas Hong Anliu o pomelo rojo Star Ruby sugieren una actividad licopeno ciclasa casi nula para este alelo (Alquezar *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2016b). Asimismo, es importante destacar que se implementó exitosamente la herramienta CRISPR-Cas9 en mandarinas, y se generaron plantas transgénicas de B30 que poseen ediciones en el gen β LCY2 (Figuras 21, 22 y 23). Este trabajo continúa actualmente para caracterizar las plantas editadas y determinar si los alelos obtenidos son funcionales o no. Si bien se ha reportado la edición transitoria en hojas de mandarina Kinnow (Manchanda *et al.*, 2023), de acuerdo a la información disponible, las plantas generadas en el marco de este trabajo de tesis serían las primeras plantas de mandarina editadas en forma estable a nivel mundial.

7. PERSPECTIVAS

El trabajo realizado en tomate sienta las bases para la incorporación de nuevos alelos generados por edición génica en el programa de mejoramiento de INIA a la vez que generó las capacidades para continuar utilizando esta herramienta para la búsqueda de nuevos genes y variantes de interés, ya sea para potenciar aún más la acumulación de carotenoides en el fruto, o para otras características de interés como la tolerancia a ciertos herbicidas o la resistencia a enfermedades, entre otras. Asimismo, hemos generado dos isolíneas (LT16-wt y LT16-*cycb* Δ 7) que contrastan en su respuesta al daño por frío y podrán utilizarse como modelo para comprender los mecanismos subyacentes a esta tolerancia en estudios futuros.

Las plantas de mandarinas B30 editadas que superen la aclimatación *ex vitro* deberán ser caracterizadas genotípicamente y fenotípicamente. En ese sentido, el contar con el sistema de complementación heteróloga *in vivo* en cepas de *E. coli* carotenogénicas, nos brinda una herramienta que nos permitirá determinar precozmente si los alelos obtenidos en B30 son funcionales. Esto nos permitirá predecir la posibilidad de que los frutos cuenten con el potencial de acumular licopeno y seleccionar las plantas que contengan estos alelos ya que, al ser plantas transgénicas, el espacio con el que contamos para cultivarlas hasta que florezcan y fructifiquen es reducido (invernadero de bioseguridad).

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abouzari A, Seh N, Nezhad M** (2016) THE INVESTIGATION OF CITRUS FRUIT QUALITY. POPULAR CHARACTERISTIC AND BREEDING. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* **64**: 725–740
- Affandi FY, Prayoga T, Ouzounis T, Giday H, Verdonk JC, Woltering EJ, Schouten RE** (2022) Additional Blue LED during Cultivation Induces Cold Tolerance in Tomato Fruit but Only to an Optimum. *Biology (Basel)* **11**: 101
- Ahrazem O, Diretto G, Argandoña Picazo J, Fiore A, Rubio-Moraga Á, Rial C, Varela RM, Macías FA, Castillo R, Romano E, et al** (2019) The specialized roles in carotenogenesis and apocarotenogenesis of the phytoene synthase gene family in saffron. *Front Plant Sci* **10**: 435338
- Alcaíno J, Baeza M, Cifuentes V** (2016) Carotenoid Distribution in Nature. *Subcell Biochem.* pp 3–33
- Al-Juhaimi FY** (2014) CITRUS FRUITS BY-PRODUCTS AS SOURCES OF BIOACTIVE COMPOUNDS WITH ANTIOXIDANT POTENTIAL. *Pak J Bot* **46**: 1459–1462
- Alós E, Distefano G, Rodrigo MJ, Gentile A, Zacarías L** (2014) Altered sensitivity to ethylene in ‘Tardivo’, a late-ripening mutant of Clementine mandarin. *Physiol Plant* **151**: 507–521
- Alquézar B** (2007) Caracterización Bioquímica y Molecular de la Carotenogénesis en Frutos Cítricos. Universidad de Valencia
- Alquézar B, Bennici S, Carmona L, Gentile A, Peña L** (2022) Generation of Transfer-DNA-Free Base-Edited Citrus Plants. *Front Plant Sci* **13**: 835282
- Alquezar B, Rodrigo MJ, Lado J, Zacarías L** (2013) A comparative physiological and transcriptional study of carotenoid biosynthesis in white and red grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.). *Tree Genet Genomes* **9**: 1257–1269
- Alquezar B, Rodrigo MJ, Zacarías L** (2008) Regulation of carotenoid biosynthesis during fruit maturation in the red-fleshed orange mutant Cara Cara. *Phytochemistry* **69**: 1997–2007
- Alquézar B, Rodrigo MJ, Zacarías L** (2008) Carotenoid Biosynthesis and their Regulation in Citrus Fruits. *Tree and Foestry Sciemce and Biotechnology* **2**: 23–35
- Alquezar B, Zacarias L, Rodrigo MJ** (2009) Molecular and functional characterization of a novel chromoplast-specific lycopene -cyclase from Citrus and its relation to lycopene accumulation. *J Exp Bot* **60**: 1783–1797
- Álvarez D, Voß B, Maass D, Wüst F, Schaub P, Beyer P, Welsch R** (2016) Carotenogenesis Is Regulated by 5'UTR-Mediated Translation of Phytoene Synthase Splice Variants. *Plant Physiol* **172**: 2314–2326
- An G-H, Schuman DB, Johnson EA** (1989) Isolation of *Phaffia rhodozyma* Mutants with Increased Astaxanthin Content. *Appl Environ Microbiol* **55**: 116–124
- Andersson M, Turesson H, Nicolai A, Fält AS, Samuelsson M, Hofvander P** (2017) Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. *Plant Cell Rep* **36**: 117–128

- Arango J, Beltrán J, Nuñez J, Chavarriaga P** (2016) Evidence of epigenetic mechanisms affecting carotenoids. *Subcell Biochem*. Springer New York, pp 295–307
- Arballo J, Amengual J, Erdman JW** (2021) Lycopene: A critical review of digestion, absorption, metabolism, and excretion. *Antioxidants* **10**: 1–16
- Arruabarrena A, Benítez-Galeano MJ, Giambiasi M, Bertalmío A, Colina R, Hernández-Rodríguez L** (2016) Application of a simple and affordable protocol for isolating plant total nucleic acids for RNA and DNA virus detection. *J Virol Methods* **237**: 14–17
- Arruabarrena A, Lado J, González-Arcos M, Vidal S** (2023) Targeted disruption of tomato chromoplast-specific lycopene β -cyclase (CYC-B) gene promotes early accumulation of lycopene in fruits and enhanced postharvest cold tolerance. *Plant Biotechnol J* **21**: 2420–2422
- Arruabarrena A, Pintos P, Luque E, Moltini AI, Rivas F, Lado J** (2019) Characterization of carotenoid accumulation in different hybrids from the Uruguayan Citrus Breeding Program. *Acta Hort* 67–72
- Arruabarrena A, Vidal S** (2025) Agrobacterium-mediated transformation for gene editing tomato elite breeding lines. *Agrobacterium, Methods and Protocols* (MANUSCRITO ACEPADO)
- Ashrafi H, Kinkade MP, Merk HL, Foolad MR** (2012) Identification of novel quantitative trait loci for increased lycopene content and other fruit quality traits in a tomato recombinant inbred line population. *Molecular Breeding* **30**: 549–567
- Astija A, Febriani VI, Alibasyah L, Isnainar I** (2023) Climate and Cultivar of Tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) Affect the Lycopene Contents. *Arch Pharm Pract* **14**: 39–43
- Bahonar A, Saadatnia M, Khorvash F, Maracy M, Khosravi A** (2017) Carotenoids as potential antioxidant agents in stroke prevention: A systematic review. *Int J Prev Med* **8**: 6–12
- Bari VK, Nassar JA, Kheredin SM, Gal-On A, Ron M, Britt A, Steele D, Yoder J, Aly R** (2019) CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE 8 in tomato provides resistance against the parasitic weed *Phelipanche aegyptiaca*. *Scientific Reports* 2019 9:1 **9**: 1–12
- Barillas AC, Mejia L, Sanchez-Perez A, Maxwell DP** (2008) CAPS and SCAR markers for detection of I-3 gene introgression for resistance to *Fusarium oxysporium* f.sp. *lycopersici* race 3.
- Barja MV, Ezquerro M, Beretta S, Diretto G, Florez-Sarasa I, Feixes E, Fiore A, Karlova R, Fernie AR, Beekwilder J, et al** (2021) Several geranylgeranyl diphosphate synthase isoforms supply metabolic substrates for carotenoid biosynthesis in tomato. *New Phytologist* **231**: 255–272
- Bartley GE, Scolniks PK** (1993) cDNA Cloning, Expression during Development, and Genome Mapping of PSY2, a Second Tomato Gene Encoding Phytoene Synthase*. *J Biol Chem* **268**: 25718–25721
- Bartley GE, Viitanen P V., Bacot KO, Scolnik PA** (1992) A tomato gene expressed during fruit ripening encodes an enzyme of the carotenoid biosynthesis pathway. *Journal of Biological Chemistry* **267**: 5036–5039
- Beltran JCM, Stange C** (2016) Apocarotenoids: A New Carotenoid-Derived Pathway. pp 239–272
- Biswas P, East AR, Hewett EW, Heyes JA** (2016) Chilling Injury in Tomato Fruit. *Hortic Rev (Am Soc Hortic Sci)*, 1st editi. John Wiley & Sons, Ltd, pp 229–278

- Boutin-Ganache I, Raposo M, Raymond M, Deschepper CF** (2001) M13-Tailed Primers Improve the Readability and Usability of Microsatellite Analyses Performed with Two Different Allele- Sizing Methods. *Biotechniques* **31**: 24–28
- Britton G** (2022) Getting to know carotenoids. *Methods Enzymol* **670**: 1–56
- Canan İ, Gündoğdu M, Seday U, Oluk CA, Karaşahin Z, Eroğlu EÇ, Yazici E, Ünlü M** (2016) Determination of antioxidant, total phenolic, total carotenoid, lycopene, ascorbic acid, and sugar contents of Citrus species and mandarin hybrids. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* **40**: 894–899
- Cao H, Luo H, Yuan H, Eissa MA, Thannhauser TW, Welsch R, Hao YJ, Cheng L, Li L** (2019) A neighboring aromatic-aromatic amino acid combination governs activity divergence between tomato phytoene synthases. *Plant Physiol* **180**: 1988–2003
- Causse M, Grandillo S** (2016) Gene Mapping in Tomato. In M Causse, J Giovannoni, M Bouzayen, M Zouine, eds, *The Tomato Genome. Compendium of Plant Genomes*. Springer, Berlin, Heidelberg, Berlin, pp 23–37
- Causse M, Stevens R, Amor B Ben, Faurobert M, Muños S** (2011) Breeding for Fruit Quality in Tomato. *Breeding for Fruit Quality*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp 279–305
- Cebolla-Cornejo J, Roselló S, Nuez F** (2013) Selection of Tomato Rich in Nutritional Terpenes. *Natural Products*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 2853–2881
- Čermák T, Baltes NJ, Čegan R, Zhang Y, Voytas DF** (2015) High-frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome Biol* **16**: 232
- Čermák T, Curtin SJ, Gil-Humanes J, Čegan R, Kono TJYY, Konečná E, Belanto JJ, Starker CG, Mathre JW, Greenstein RL, et al** (2017) A Multipurpose Toolkit to Enable Advanced Genome Engineering in Plants. *Plant Cell* **29**: 1196–1217
- Chattopadhyay T, Hazra P, Akhtar S, Maurya D, Mukherjee A, Roy S** (2021) Skin colour, carotenogenesis and chlorophyll degradation mutant alleles: genetic orchestration behind the fruit colour variation in tomato. *Plant Cell Rep* **40**: 767–782
- Chaudhary PR, Bang H, Jayaprakasha GK, Patil BS** (2016) Variation in Key Flavonoid Biosynthetic Enzymes and Phytochemicals in ‘Rio Red’ Grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) during Fruit Development. *J Agric Food Chem* **64**: 9022–9032
- Chen L, Li W, Li Y, Feng X, Du K, Wang G, Zhao L** (2019) Identified trans-splicing of YELLOW-FRUITED TOMATO 2 encoding the PHYTOENE SYNTHASE 1 protein alters fruit color by map-based cloning, functional complementation and RACE. *Plant Mol Biol* **100**: 647–658
- Chen X, Han H, Cong Y, Li X, Zhang W, Wan W, Cui J, Xu W, Diao M, Liu H** (2023) The Protective Effect of Exogenous Ascorbic Acid on Photosystem Inhibition of Tomato Seedlings Induced by Salt Stress. *Plants*. doi: 10.3390/plants12061379
- Chen Y-H, Sharma S, Bewg P, Xue L-J, Gizelbach CR, Tsai C-J** (2022) Multiplex editing of the Nucleoredoxin1 tandem array in poplar: Decrypting outcomes due to CRISPR/Cas9-mediated translocations and complex inversions. *bioRxiv* 2022.08.26.505498
- Cookson PJ, Kiano JW, Shipton CA, Fraser PD, Romer S, Schuch W, Bramley PM, Pyke KA** (2003) Increases in cell elongation, plastid compartment size and phytoene synthase activity underlie the phenotype of the high pigment-1 mutant of tomato. *Planta* **217**: 896–903

- Cox DBT, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Franklin B, Kellner MJ, Joung J, Zhang F** (2017) RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science* (1979) **358**: 1019–1027
- Csizinszky AA** (2005) Production in the open field. Tomatoes. CABI Publishing, pp 237–256
- Dahan-Meir T, Filler-Hayut S, Melamed-Bessudo C, Bocobza S, Czosnek H, Aharoni A, Levy AA** (2018) Efficient in planta gene targeting in tomato using geminiviral replicons and the CRISPR/Cas9 system. *The Plant Journal* **95**: 5–16
- D'Ambrosio C, Giorio G, Marino I, Merendino A, Petrozza A, Salfi L, Stigliani AL, Cellini F** (2004) Virtually complete conversion of lycopene into β -carotene in fruits of tomato plants transformed with the tomato lycopene β -cyclase (tlcy-b) cDNA. *Plant Science* **166**: 207–214
- D'Ambrosio C, Stigliani AL, Giorio G** (2018) CRISPR/Cas9 editing of carotenoid genes in tomato. *Transgenic Res* **27**: 367–378
- Deng Z, Xu J** (2011) Breeding for Fruit Quality in Citrus. In MA Jenks, PJ Bebeli, eds, *Breeding for Fruit Quality*. John Wiley & Sons, Inc., pp 349–371
- Deng Z, Xu J, Causse M, Stevens R, Amor B Ben, Faurobert M, Muños S** (2011) Breeding for Fruit Quality. *Breeding for Fruit Quality*. doi: 10.1002/9780470959350
- Diamanti J, Battino M, Mezzetti B** (2011) Breeding for Fruit Nutritional and Nutraceutical Quality. *Breeding for Fruit Quality*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp 61–79
- Ding CK, Wang CY, Gross KC, Smith DL** (2001) Reduction of chilling injury and transcript accumulation of heat shock proteins in tomato fruit by methyl jasmonate and methyl salicylate. *Plant Science* **161**: 1153–1159
- Doll NM, Gilles LM, Gérentes MF, Richard C, Just J, Fierlej Y, Borrelli VMG, Gendrot G, Ingram GC, Rogowsky PM, et al** (2019) Single and multiple gene knockouts by CRISPR–Cas9 in maize. *Plant Cell Reports* 2019 38:4 **38**: 487–501
- Dong OX, Yu S, Jain R, Zhang N, Duong PQ, Butler C, Li Y, Lipzen A, Martin JA, Barry KW, et al** (2020) Marker-free carotenoid-enriched rice generated through targeted gene insertion using CRISPR-Cas9. *Nature Communications* 2020 11:1 **11**: 1–10
- Dongariyal A, Chandra AK, Dongriyal A, Kumar A, Sharma P** (2023) Tending genome editing via CRISPR/Cas9-induced mutagenesis: Opportunity and challenges for yield, quality and nutritional improvement of fruit crops. *Sci Hortic* **311**: 111790
- Duduit JR, Kosentka PZ, Miller MA, Blanco-Ulate B, Lenucci MS, Panthee DR, Perkins-Veazie P, Liu W** (2022) Coordinated transcriptional regulation of the carotenoid biosynthesis contributes to fruit lycopene content in high-lycopene tomato genotypes. *Hortic Res*. doi: 10.1093/HR/UHAC084
- Dulińska-Litewka J, Hałubiec P, Łazarczyk A, Szafranski O, Sharoni Y, McCubrey JA, Gąsioriewicz B, Bohn T** (2021) Recent Progress in Discovering the Role of Carotenoids and Metabolites in Prostatic Physiology and Pathology—A Review—Part II: Carotenoids in the Human Studies. *Antioxidants* 2021, Vol 10, Page 319 **10**: 319
- Dutt M, Erpen L, Grosser JW** (2018) Genetic transformation of the 'W Murcott' tangor: comparison between different techniques. *Sci Hortic* **242**: 90–94

- Dutt M, Grosser JW** (2009) Evaluation of parameters affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **98**: 331–340
- Dutt M, Grosser JW** (2010) An embryogenic suspension cell culture system for *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus. *Plant Cell Rep* **29**: 1251–1260
- Dutt M, Mahmoud LM, Nehela Y, Grosser JW, Killiny N** (2022) The *Citrus sinensis* TILLER ANGLE CONTROL 1 (CsTAC1) gene regulates tree architecture in sweet oranges by modulating the endogenous hormone content. *Plant Science* **323**: 111401
- Efremov GI, Slugina MA, Shchennikova A V., Kochieva EZ** (2020) Differential Regulation of Phytoene Synthase PSY1 During Fruit Carotenogenesis in Cultivated and Wild Tomato Species (*Solanum section Lycopersicon*). *Plants* 2020, Vol 9, Page 1169 **9**: 1169
- Elvira-Torales LI, García-Alonso J, Periago-Castón MJ** (2019) Nutritional Importance of Carotenoids and Their Effect on Liver Health: A Review. *Antioxidants* **8**: 229
- Ezura H** (2022) Letter to the Editor: The World's First CRISPR Tomato Launched to a Japanese Market: The Social-Economic Impact of its Implementation on Crop Genome Editing. *Plant Cell Physiol* **63**: 731–733
- Fanciullino A-L, Dhuique-Mayer C, Froelicher Y, Talón M, Ollitrault P, Morillon R, Morillon R** (2008) Changes in Carotenoid Content and Biosynthetic Gene Expression in Juice Sacs of Four Orange Varieties (*Citrus sinensis*) Differing in Flesh Fruit Color. *J Agric Food Chem* **56**: 3628–3638
- Fanciullino A-L, Dhuique-Mayer C, Luro F, Casanova J, Morillon R, Ollitrault P** (2006) Carotenoid Diversity in Cultivated Citrus Is Highly Influenced by Genetic Factors. *J Agric Food Chem* **54**: 4397–4406
- Fantini E, Falcone G, Frusciante S, Giliberto L, Giuliano G** (2013) Dissection of tomato lycopene biosynthesis through virus-induced gene silencing. *Plant Physiol* **163**: 986–98
- Feng Y, Kou X, Yuan S, Wu C, Zhao X, Xue Z, Li Q, Huang Z, Sun Y** (2023) CRISPR/Cas9-mediated SNAC9 mutants reveal the positive regulation of tomato ripening by SNAC9 and the mechanism of carotenoid metabolism regulation. *Hortic Res.* doi: 10.1093/HR/UHAD019
- Fernandez-Pozo N, Zheng Y, Snyder SI, Nicolas P, Shinozaki Y, Fei Z, Catala C, Giovannoni JJ, Rose JKC, Mueller LA** (2017) The Tomato Expression Atlas. *Bioinformatics* **33**: 2397–2398
- Fleitas AL, Señorale M, Vidal S** (2022) A Robust Expression and Purification Method for Production of SpCas9-GFP-MBP Fusion Protein for In Vitro Applications. *Methods and Protocols* 2022, Vol 5, Page 44 **5**: 44
- Fonseca R, Capel C, Nieto-Canseco R, Ortiz-Atienza A, Bretones S, López-Fábregas JD, Quevedo-Colmena AS, Lebrón R, Barragán-Lozano T, Villalobos-Ramírez V, et al** (2022) A Tomato EMS-Mutagenized Population Provides New Valuable Resources for Gene Discovery and Breeding of Developmental Traits. *Plants* **11**: 2453
- Foolad MR** (2013) HIGH LYCOPENE CONTENT TOMATO PLANTS AND MARKERS FOR USE IN BREEDING FOR SAME.
- Foolad MR, Panthee DR** (2012) Marker-Assisted Selection in Tomato Breeding. *CRC Crit Rev Plant Sci* **31**: 93–123

- Foolad MR, Sharma A** (2005) Molecular markers as selection tools in tomato breeding. *Acta Hort* 225–240
- Fraser PD, Römer S, Kiano JW, Shipton CA, Mills PB, Drake R, Schuch W, Bramley PM** (2001) Elevation of carotenoids in tomato by genetic manipulation. *J Sci Food Agric* **81**: 822–827
- Fraser PD, Schuch W, Bramley PM** (2000) Phytoene synthase from tomato (*Lycopersicon esculentum*) chloroplasts - Partial purification and biochemical properties. *Planta* **211**: 361–369
- Fray RG, Grierson D** (1993) Identification and genetic analysis of normal and mutant phytoene synthase genes of tomato by sequencing, complementation and co-suppression. *Plant Mol Biol* **22**: 589–602
- Gascuel Q, Diretto G, Monforte AJ, Fortes AM, Granel A** (2017) Use of Natural Diversity and Biotechnology to Increase the Quality and Nutritional Content of Tomato and Grape. *Front Plant Sci* **8**: 652
- Gasser SM, Amati BB, Cardenas ME, Hofmann JFX** (1989) Studies on scaffold attachment sites and their relation to genome function. *Int Rev Cytol* **119**: 57–96
- Giorio G, Stigliani AL, D'Ambrosio C** (2008) Phytoene synthase genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) - new data on the structures, the deduced amino acid sequences and the expression patterns. *FEBS Journal* **275**: 527–535
- Giorio G, Yildirim A, Stigliani AL, D'Ambrosio C** (2013) Elevation of lutein content in tomato: A biochemical tug-of-war between lycopene cyclases. *Metab Eng* **20**: 167–176
- Gómez PA, Camelo AFL** (2002) Calidad postcosecha de tomates almacenados en atmósferas controladas. *Hortic Bras* **20**: 38–43
- Gómez-Sagasti MT, López-Pozo M, Artetxe U, Becerril JM, Hernández A, García-Plazaola JI, Esteban R** (2023) Carotenoids and their derivatives: A “Swiss Army knife-like” multifunctional tool for fine-tuning plant-environment interactions. *Environ Exp Bot* **207**: 105229
- Gowik U, Burscheidt J, Akyildiz M, Schlue U, Koczor M, Streubel M, Westhoff P** (2004) cis-Regulatory elements for mesophyll-specific gene expression in the C4 plant *Flaveria trinervia*, the promoter of the C4 phosphoenolpyruvate carboxylase gene. *Plant Cell* **16**: 1077–1090
- Grosser J, Gmitter F** (2011) Protoplast fusion for production of tetraploids and triploids: applications for scion and rootstock breeding in citrus. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **104**: 343–357
- Guo F, Zhou W, Zhang J, Xu Q, Deng X** (2012) Effect of the Citrus Lycopene β -Cyclase Transgene on Carotenoid Metabolism in Transgenic Tomato Fruits. *PLoS One* **7**: e32221
- Gupta NP, Kumar R** (2002) Lycopene therapy in idiopathic male infertility - A preliminary report. *Int Urol Nephrol* **34**: 369–372
- Haeussler M, Schöning K, Eckert H, Eschstruth A, Mianné J, Renaud J-B, Schneider-Maunoury S, Shkumatava A, Teboul L, Kent J, et al** (2016) Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. *Genome Biol* **17**: 148
- Hall TA** (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series No. 41*. Oxford University Press, pp 95–98

- Han Y, Zheng QS, Wei YP, Chen J, Liu R, Wan HJ** (2015) In silico identification and analysis of phytoene synthase genes in plants. *Genetics and Molecular Research* **14**: 9412–9422
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T** (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res* **27**: 297–300
- Hodges DM, Lester GE, Munro KD, Toivonen PMA** (2004) Oxidative stress: Importance for postharvest quality. *HortScience* **39**: 924–929
- Howitt CA, Cavanagh CR, Bowerman AF, Cazzonelli C, Rampling L, Mimica JL, Pogson BJ** (2009) Alternative splicing, activation of cryptic exons and amino acid substitutions in carotenoid biosynthetic genes are associated with lutein accumulation in wheat endosperm. *Funct Integr Genomics* **9**: 363–376
- Hu W, Zhou T, Han Z, Tan C, Xing Y** (2020) Dominant complementary interaction between OsC1 and two tightly linked genes, Rb1 and Rb2, controls the purple leaf sheath in rice. *Theoretical and Applied Genetics* **133**: 2555–2566
- Huang X, Wang Y, Wang N** (2022a) Highly Efficient Generation of Canker-Resistant Sweet Orange Enabled by an Improved CRISPR/Cas9 System. *Front Plant Sci* **12**: 769907
- Huang X, Wang Y, Wang N** (2022b) Base Editors for Citrus Gene Editing. *Front Genome Ed* **4**: 852867
- Huang X, Wang Y, Xu J, Wang N** (2020) Development of multiplex genome editing toolkits for citrus with high efficacy in biallelic and homozygous mutations. *Plant Mol Biol* **104**: 297–307
- Hudson ME, Quail PH** (2003) Identification of Promoter Motifs Involved in the Network of Phytochrome A-Regulated Gene Expression by Combined Analysis of Genomic Sequence and Microarray Data. *Plant Physiol* **133**: 1605–1616
- Hunziker J, Nishida K, Kondo A, Ariizumi T, Ezura H** (2022) Phenotypic Characterization of High Carotenoid Tomato Mutants Generated by the Target-AID Base-Editing Technology. *Front Plant Sci* **0**: 2363
- Hunziker J, Nishida K, Kondo A, Kishimoto S, Ariizumi T, Ezura H** (2020) Multiple gene substitution by Target-AID base-editing technology in tomato. *Sci Rep* **10**: 1–12
- Hutton SF, Scott JW, Freeman Joshua H.** (2020) ‘Solar Dancer’ Hybrid Tomato: Fla. 8814 and Fla. 8925 Breeding Lines. *HortScience* **55**: 746–748
- Hwang I, Kim Y, Han J, Nou IS** (2016) Orange color is associated with CYC-B expression in tomato fleshy fruit. *Molecular Breeding* **36**: 42
- Iglesias-Sanchez A, Navarro-Carcelen J, Morelli L, Rodriguez-Concepcion M** (2023) Arabidopsis FIBRILLIN6 influences carotenoid biosynthesis by directly promoting phytoene synthase activity. *Plant Physiol.* doi: 10.1093/PLPHYS/KIAD613
- Ilahy R, Siddiqui MW, Tlili I, Montefusco A, Piro G, Hdidier C, Lenucci MS** (2018) When Color Really Matters: Horticultural Performance and Functional Quality of High-Lycopene Tomatoes. *CRC Crit Rev Plant Sci.* doi: 10.1080/07352689.2018.1465631
- Iqbal Z, Iqbal MS, Ahmad A, Memon AG, Ansari MI** (2020) New prospects on the horizon: Genome editing to engineer plants for desirable traits. *Curr Plant Biol* 100171

- Isaacson T, Ronen G, Zamir D, Hirschberg J** (2002) Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of beta-carotene and xanthophylls in plants. *Plant Cell* **14**: 333–42
- Jannatizadeh A, Aghdam MS, Luo Z, Razavi F** (2019) Impact of Exogenous Melatonin Application on Chilling Injury in Tomato Fruits During Cold Storage. *Food Bioproc Tech* **12**: 741–750
- Jeffery J, Holzenburg A, King S** (2012) Physical barriers to carotenoid bioaccessibility. Ultrastructure survey of chromoplast and cell wall morphology in nine carotenoid-containing fruits and vegetables. *J Sci Food Agric* **92**: 2594–2602
- Jia H, Omar AA, Orbovic V, Wang N** (2022a) Biallelic Editing of the LOB1 Promoter via CRISPR/Cas9 Creates Canker-Resistant ‘Duncan’ Grapefruit. *Phytopathology* **112**: 308–314
- Jia H, Orbovic V, Jones JB, Wang N** (2016) Modification of the PthA4 effector binding elements in Type I CsLOB1 promoter using Cas9/sgRNA to produce transgenic Duncan grapefruit alleviating XccΔpthA4:dCsLOB1.3 infection. *Plant Biotechnol J* **14**: 1291–1301
- Jia H, Orbović V, Wang N** (2019) CRISPR-LbCas12a-mediated modification of citrus. *Plant Biotechnol J* **17**: 1928–1937
- Jia H, Wang N** (2014a) Targeted Genome Editing of Sweet Orange Using Cas9/sgRNA. *PLoS One* **9**: e93806
- Jia H, Wang N** (2014b) Xcc-facilitated agroinfiltration of citrus leaves: a tool for rapid functional analysis of transgenes in citrus leaves. *Plant Cell Rep* **33**: 1993–2001
- Jia H, Wang N** (2020) Generation of homozygous canker-resistant citrus in the T0 generation using CRISPR-SpCas9p. *Plant Biotechnol J* **18**: 1990
- Jia H, Wang Y, Su H, Huan X, Wang N** (2022b) LbCas12a-D156R Efficiently Edits LOB1 Effector Binding Elements to Generate Canker-Resistant Citrus Plants. *Cells* **11**: 315
- Jia H, Xu J, Orbović V, Zhang Y, Wang N** (2017a) Editing Citrus Genome via SaCas9/sgRNA System. *Front Plant Sci* **8**: 2135
- Jia H, Zhang Y, Orbović V, Xu J, White FF, Jones JB, Wang N** (2017b) Genome editing of the disease susceptibility gene *CsLOB1* in citrus confers resistance to citrus canker. *Plant Biotechnol J* **15**: 817–823
- Jiang W, Zhou H, Bi H, Fromm M, Yang B, Weeks DP** (2013) Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res* **41**: e188
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E** (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* (1979) **337**: 816–821
- Kang MS, Kim YJ, Heo J, Rajendran S, Wang X, Bae JH, Lippman Z, Park SJ** (2022) Newly Discovered Alleles of the Tomato Antiflorigen Gene SELF PRUNING Provide a Range of Plant Compactness and Yield. *Int J Mol Sci*. doi: 10.3390/IJMS23137149
- Karniel U, Koch A, Zamir D, Hirschberg J** (2020) Development of zeaxanthin-rich tomato fruit through genetic manipulations of carotenoid biosynthesis. *Plant Biotechnol J* pbi.13387

- Kato M** (2012) Mechanism of Carotenoid Accumulation in Citrus Fruit. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **81**: 219–233
- Kato M, Ikoma Y, Matsumoto H, Sugiura M, Hyodo H, Yano M** (2004) Accumulation of Carotenoids and Expression of Carotenoid Biosynthetic Genes during Maturation in Citrus Fruit. *Plant Physiol* **134**: 824–837
- Kato M, Matsumoto H, Ikoma Y, Kuniga T, Nakajima N, Yoshida T, Yano M** (2007) Accumulation of Carotenoids and Expression of Carotenoid Biosynthetic Genes and Carotenoid Cleavage Dioxygenase Genes during Fruit Maturation in the Juice Sacs of ‘Tamami,’ ‘Kiyomi’ Tangor, and ‘Wilking’ Mandarin. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **76**: 103–111
- Kaur N, Alok A, Shivani, Kumar P, Kaur N, Awasthi P, Chaturvedi S, Pandey P, Pandey A, Pandey AK, et al** (2020) CRISPR/Cas9 directed editing of lycopene epsilon-cyclase modulates metabolic flux for β -carotene biosynthesis in banana fruit. *Metab Eng* **59**: 76–86
- Khan SH, Tariq H, Farooq I, Tasleem H, Ghouri MZ, Mubarik MS, Khan Z** (2022) Applications of CRISPR/Cas System in Plants. *The CRISPR/Cas Tool Kit for Genome Editing*. Springer Nature, pp 285–309
- Khan UM, Sevindik M, Zarrabi A, Nami M, Ozdemir B, Kaplan DN, Selamoglu Z, Hasan M, Kumar M, Alshehri MM, et al** (2021) Lycopene: Food Sources, Biological Activities, and Human Health Benefits. *Oxid Med Cell Longev* **2021**: 1–10
- Kim JH, Yu J, Kim HK, Kim JY, Kim MS, Cho YG, Bae S, Kang KK, Jung YJ** (2022) Genome Editing of Golden SNP-Carrying Lycopene Epsilon-Cyclase (LcyE) Gene Using the CRISPR-Cas9/HDR and Geminiviral Replicon System in Rice. *Int J Mol Sci* **23**: 10383
- Kinkade MP, Foolad MR** (2013) Validation and fine mapping of lyc12.1, a QTL for increased tomato fruit lycopene content. *Theoretical and Applied Genetics* **126**: 2163–2175
- Koonin E V., Makarova KS, Zhang F** (2017) Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Microbiol* **37**: 67–78
- Kulczyński B, Sidor A, Brzozowska A, Gramza-Michałowska A** (2024) The role of carotenoids in bone health—A narrative review. *Nutrition* **119**: 112306
- Kyriacou MC, Rouphael Y** (2018) Towards a new definition of quality for fresh fruits and vegetables. *Sci Hortic* **234**: 463–469
- Lado J, Cronje P, Alquézar B, Page A, Manzi M, Gómez-Cadenas A, Stead AD, Zacarías L, Rodrigo MJ** (2015a) Fruit shading enhances peel color, carotenes accumulation and chromoplast differentiation in red grapefruit. *Physiol Plant* **154**: 469–484
- Lado J, Rodrigo MJ, Cronje P, Zacarías L** (2015b) Involvement of lycopene in the induction of tolerance to chilling injury in grapefruit. *Postharvest Biol Technol* **100**: 176–186
- Lado J, Rodrigo MJ, López-Climent M, Gómez-Cadenas A, Zacarías L** (2016a) Implication of the antioxidant system in chilling injury tolerance in the red peel of grapefruit. *Postharvest Biol Technol* **111**: 214–223
- Lado J, Rodrigo MJ, Zacarías L, Review SP** (2014) Maturity indicators and citrus fruit quality. *Stewart Postharvest Review* **10**: 1–6

- Lado J, Zacarías L, Rodrigo MJ** (2016b) Regulation of Carotenoid Biosynthesis During Fruit Development. *In* C Stange, ed, Carotenoids in Nature. Springer New York, pp 161–198
- Lakshmi Jayaraj K, Thulasidharan N, Antony A, John M, Augustine R, Chakravartty N, Sukumaran S, Uma Maheswari M, Abraham S, Thomas G, et al** (2021) Targeted editing of tomato carotenoid isomerase reveals the role of 5' UTR region in gene expression regulation. *Plant Cell Reports* 2021 40:4 **40**: 621–635
- Lana G, Zacarias-Garcia J, Distefano G, Gentile A, Rodrigo MJ, Zacarias L** (2020) Transcriptional analysis of carotenoids accumulation and metabolism in a pink-fleshed lemon mutant. *Genes (Basel)* **11**: 1–16
- Leiva-Brondo M, Valcarcel M, Martí R, Roselló S, Cebolla-Cornejo J, Leiva-Brondo M, Valcarcel M, Martí R, Roselló S, Cebolla-Cornejo J** (2016) New opportunities for developing tomato varieties with enhanced carotenoid content. *Sci Agric* **73**: 512–519
- Levin I, de Vos C, Tadmor Y, Bovy A, Lieberman M, Oren-Shamir M, Segev O, Kolotilin I, Keller M, Ovadia R, et al** (2006) High pigment tomato mutants—more than just lycopene (a review). *Isr J Plant Sci* **54**: 179–190
- Li D, Shi W, Deng X** (2002) Agrobacterium -mediated transformation of embryogenic calluses of Ponkan mandarin and the regeneration of plants containing the chimeric ribonuclease gene. *Plant Cell Rep* **21**: 153–156
- Li J, Zhang C, He Y, Li S, Yan L, Li Y, Zhu Z, Xia L** (2023) Plant base editing and prime editing: The current status and future perspectives. *J Integr Plant Biol* **65**: 444–467
- Li P, Yin F, Song L, Zheng X** (2016) Alleviation of chilling injury in tomato fruit by exogenous application of oxalic acid. *Food Chem* **202**: 125–132
- Li X, Wang Y, Chen S, Tian H, Fu D, Zhu B, Luo Y, Zhu H** (2018) Lycopene Is Enriched in Tomato Fruit by CRISPR/Cas9-Mediated Multiplex Genome Editing. *Front Plant Sci* **9**: 559
- Lieberman M, Segev O, Gilboa N, Lalazar A, Levin I** (2004) The tomato homolog of the gene encoding UV-damaged DNA binding protein 1 (DDB1) underlined as the gene that causes the high pigment-1 mutant phenotype. *Theoretical and Applied Genetics* **108**: 1574–1581
- Lin T, Zhu G, Zhang J, Xu X, Yu Q, Zheng Z, Zhang Z, Lun Y, Li S, Wang X, et al** (2014) Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. *Nat Genet* **46**: 1220–1226
- Lisboa MP, Canal D, Filgueiras JPC, Turchetto-Zolet AC** (2022) Molecular evolution and diversification of phytoene synthase (PSY) gene family. *Genet Mol Biol* **45**: e20210411
- Liu C, Yan F, Gao H, He M, Wang Z, Cheng Y, Deng X, Xu J** (2015a) Features of citrus terpenoid production as revealed by carotenoid, limonoid and aroma profiles of two pummelos (*Citrus maxima*) with different flesh color. *J Sci Food Agric* **95**: 111–119
- Liu L, Shao Z, Zhang M, Wang Q** (2015b) Regulation of Carotenoid Metabolism in Tomato. *Mol Plant* **8**: 28–39
- Liu Q, Xu J, Liu Y, Zhao X, Deng X, Guo L, Gu J** (2007) A novel bud mutation that confers abnormal patterns of lycopene accumulation in sweet orange fruit (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *J Exp Bot* **58**: 4161–4171

- Liu W, Ye Q, Jin X, Han F, Huang X, Cai S, Yang L** (2016) A spontaneous bud mutant that causes lycopene and β -carotene accumulation in the juice sacs of the parental Guanxi pummelo fruits (*Citrus grandis* (L.) Osbeck). *Sci Hortic* **198**: 379–384
- Liu Y, Roof S, Ye Z, Barry C, Van Tuinent A, Vrebalov J, Bowler C, Giovannoni J** (2004) Manipulation of light signal transduction as a means of modifying fruit nutritional quality in tomato. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 9897–9902
- Livak KJ, Schmittgen TD** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods* **25**: 402–408
- Llorente B, D'Andrea L, Ruiz-Sola MA, Botterweg E, Pulido P, Andilla J, Loza-Alvarez P, Rodriguez-Concepcion M** (2016) Tomato fruit carotenoid biosynthesis is adjusted to actual ripening progression by a light-dependent mechanism. *The Plant Journal* **85**: 107–119
- Llorente B, Martinez-Garcia JF, Stange C, Rodriguez-Concepcion M** (2017) Illuminating colors: regulation of carotenoid biosynthesis and accumulation by light. *Curr Opin Plant Biol* **37**: 49–55
- Loke JC, Stahlberg EA, Strenski DG, Haas BJ, Wood PC, Qingshun QL** (2005) Compilation of mRNA polyadenylation signals in Arabidopsis revealed a new signal element and potential secondary structures. *Plant Physiol* **138**: 1457–1468
- Lu S, Zhang Y, Zheng X, Zhu K, Xu Q, Deng X** (2016a) Isolation and Functional Characterization of a Lycopene β -cyclase Gene Promoter from Citrus. *Front Plant Sci* **7**: 1367
- Lu S, Zhang Y, Zheng X, Zhu K, Xu Q, Deng X** (2016b) Molecular characterization, critical amino acid identification, and promoter analysis of a lycopene β -cyclase gene from citrus. *Tree Genet Genomes* **12**: 106
- Lu Y, Shen X, Li Y, Xu Y, Chen Y, Chen Y, Hu X, Li X, Sun X, Gong J** (2024) Regulation of chlorophyll and carotenoid metabolism in citrus fruit. *Hortic Plant J*. doi: 10.1016/J.HPJ.2024.02.004
- Lu Y, Tian Y, Shen R, Yao Q, Zhong D, Zhang X, Zhu JK** (2021) Precise genome modification in tomato using an improved prime editing system. *Plant Biotechnol J* **19**: 415
- Luengwilai K, Beckles DM, Saltveit ME** (2012) Chilling-injury of harvested tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cv. Micro-Tom fruit is reduced by temperature pre-treatments. *Postharvest Biol Technol* **63**: 123–128
- Ma C, Ma B, He J, Hao Q, Lu X, Wang L** (2010) Regulation of Carotenoid Content in Tomato by Silencing of Lycopene β/ϵ -Cyclase Genes. *Plant Molecular Biology Reporter* **29**: 117–124
- Ma G, Zhang L, Kato M** (2023) Molecular regulation of carotenoid biosynthesis in citrus juice sacs: New advances. *Sci Hortic* **309**: 111629
- Ma G, Zhang L, Sugiura M, Kato M** (2020) Citrus and health. *The Genus Citrus* 495–511
- Maass D, Arango J, Wüst F, Beyer P, Welsch R** (2009) Carotenoid Crystal Formation in Arabidopsis and Carrot Roots Caused by Increased Phytoene Synthase Protein Levels. *PLoS One* **4**: e6373
- Manchanda P, Kaur H, Khan F, Sidhu GS, Hunjan MS, Chhuneja P, Bains NS** (2023) Agroinfiltration-based transient genome editing for targeting phytoene desaturase gene in kinnow mandarin (*C. reticulata* Blanco). *Mol Biotechnol* 1–12

- Maoka T** (2020) Carotenoids as natural functional pigments. *J Nat Med* **74**: 1–16
- Mascia T, Santovito E, Gallitelli D, Cillo F** (2010) Evaluation of reference genes for quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction normalization in infected tomato plants. *Mol Plant Pathol* **11**: 805–816
- McQuinn RP, Wong B, Giovannoni JJ** (2018) AtPDS overexpression in tomato: exposing unique patterns of carotenoid self-regulation and an alternative strategy for the enhancement of fruit carotenoid content. *Plant Biotechnol J* **16**: 482–494
- Mejía-Torres S, Vega-García M, Valverde-Juárez J, López-Valenzuela J, Caro-Corrales J** (2009) EFFECT OF WAX APPLICATION ON THE QUALITY, LYCOPENE CONTENT AND CHILLING INJURY OF TOMATO FRUIT. *J Food Qual* **32**: 735–746
- Mendes AFS, Chen C, Gmitter FG, Moore GA, Costa MGC** (2011) Expression and phylogenetic analysis of two new lycopene β -cyclases from *Citrus paradisi*. *Physiol Plant* **141**: 1–10
- Mi J, Vallarino JG, Petřík I, Novák O, Correa SM, Chodasiewicz M, Havaux M, Rodriguez-Concepcion M, Al-Babili S, Fernie AR, et al** (2022) A manipulation of carotenoid metabolism influence biomass partitioning and fitness in tomato. *Metab Eng* **70**: 166–180
- Min D, Li F, Zhang X, Cui X, Shu P, Dong L, Ren C** (2018) SIMYC2 Involved in Methyl Jasmonate-Induced Tomato Fruit Chilling Tolerance. *J Agric Food Chem* **66**: 3110–3117
- Minoia S, Petrozza A, D’Onofrio O, Piron F, Mosca G, Sozio G, Cellini F, Bendahmane A, Carriero F** (2010) A new mutant genetic resource for tomato crop improvement by TILLING technology. *BMC Res Notes*. doi: 10.1186/1756-0500-3-69
- Misawa N, Shimada H** (1998) Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts. *J Biotechnol* **59**: 169–181
- Misawa N, Takemura M, Maoka T** (2021) Carotenoid Biosynthesis in Animals: Case of Arthropods. *Adv Exp Med Biol* **1261**: 217–220
- Mohan V, Pandey A, Sreelakshmi Y, Sharma R, Huang M, Vrebalov J** (2016) Neofunctionalization of Chromoplast Specific Lycopene Beta Cyclase Gene (CYC-B) in Tomato Clade. *PLoS One* **11**: e0153333
- Moise AR, Bandara S, von Lintig J** (2022) Carotenoid modifying enzymes in metazoans. *Methods Enzymol.* NIH Public Access, pp 405–445
- Moltini AI, Luque E, Pintos P, Rivas F, Ares G, Alcaire F, Ibañez F, Lado J** (2018) LOS FRUTOS CÍTRICOS: color, sabor y salud. *Revista INIA* 45–48
- Moniruzzaman M, Zhong Y, Huang Z, Yan H, Yuanda L, Jiang B, Zhong G** (2021) Citrus Cell Suspension Culture Establishment, Maintenance, Efficient Transformation and Regeneration to Complete Transgenic Plant. *Plants* 2021, Vol 10, Page 664 **10**: 664
- Morelli L, Rodriguez-Concepcion M** (2023) Open avenues for carotenoid biofortification of plant tissues. *Plant Commun* **4**: 100466
- Moreno JC, Mi J, Alagoz Y, Al-Babili S** (2021) Plant apocarotenoids: from retrograde signaling to interspecific communication. *The Plant Journal* **105**: 351–375

- Moreno JC, Stange C** (2022) Heterologous complementation in bacteria for functional analysis of genes encoding carotenoid biosynthetic enzymes. *Methods Enzymol* **671**: 471–488
- Mustilli AC, Fenzi F, Ciliento R, Alfano F, Bowler C** (1999) Phenotype of the Tomato high pigment-2 Mutant Is Caused by a Mutation in the Tomato Homolog of DEETIOLATED1. *Plant Cell* **11**: 145–157
- Natalini A, Acciarri N, Cardi T** (2021) Breeding for Nutritional and Organoleptic Quality in Vegetable Crops: The Case of Tomato and Cauliflower. *Agriculture* **11**: 606
- Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, Jones JDG, Kamoun S** (2013) Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol* **31**: 691–693
- Nguyen M, Francis D, Schwartz S** (2001) Thermal isomerisation susceptibility of carotenoids in different tomato varieties. *J Sci Food Agric* **81**: 910–917
- NIKLITSCHKE M, ALCAÍNO J, BARAHONA S, Sepúlveda D, Lozano C, CARMONA M, MARCOLETA A, MARTÍNEZ C, Lodato P, Baeza M, et al** (2008) Genomic organization of the structural genes controlling the astaxanthin biosynthesis pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biol Res*. doi: 10.4067/S0716-97602008000100011
- Nishimura DS, Latado RR, Junior TC, Nogueira FTS, Peres LEP** (2012) Perfil transcricional dos genes envolvidos na via de biossíntese de carotenóides e quantificação dos metabólitos em laranjas de polpa vermelha. Universidade de São Paulo
- Omar AA, Dutt M, Gmitter FG, Grosser JW** (2016) Somatic embryogenesis: Still a relevant technique in citrus improvement. *Methods in Molecular Biology* **1359**: 289–327
- Pal H, kundu A, Sahu R, Sethi A, Hazra P, Chatterjee S** (2019) Unraveling the metabolic behavior in tomato high pigment mutants (hp-1, hp-2dg, ogc) and non ripening mutant (rin) during fruit ripening. *Sci Hortic* **246**: 652–663
- Pan C, Ye L, Qin L, Liu X, He Y, Wang J, Chen L, Lu G** (2016) CRISPR / Cas9-mediated efficient and heritable targeted mutagenesis in tomato plants in the first and later generations. *Nature Publishing Group* **6**: 2–10
- Parajuli S, Huo H, Gmitter FG, Duan Y, Luo F, Deng Z** (2022) Editing the CsDMR6 gene in citrus results in resistance to the bacterial disease citrus canker. *Hortic Res*. doi: 10.1093/HR/UHAC082
- Passam HC, Karapanos IC, Alexopoulos AA** (2011) The Biological Basis of Fruit Quality. *Breeding for Fruit Quality* 3–38
- Paul JY, Khanna H, Kleidon J, Hoang P, Geijskes J, Daniells J, Zaplin E, Rosenberg Y, James A, Mlalazi B, et al** (2017) Golden bananas in the field: elevated fruit pro-vitamin A from the expression of a single banana transgene. *Plant Biotechnol J* **15**: 520–532
- Pecker I, Gabbay R, Cunningham FX, Hirschberg J** (1996) Cloning and characterization of the cDNA for lycopene β -cyclase from tomato reveals decrease in its expression during fruit ripening. *Plant Molecular Biology* 1996 30:4 **30**: 807–819
- Peet MM, Welles G** (2005) Greenhouse tomato production. *Tomatoes*. CABI, Wallingford, pp 257–304
- Peng A, Chen S, Lei T, Xu L, He Y, Wu L, Yao L, Zou X** (2017) Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene *CsLOB1* promoter in citrus. *Plant Biotechnol J*. doi: 10.1111/pbi.12733

- Peng G, Wang C, Song S, Fu X, Azam M, Grierson D, Xu C** (2013) The role of 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate synthase and phytoene synthase gene family in citrus carotenoid accumulation. *Plant Physiology and Biochemistry* **71**: 67–76
- Peters JL, van Tuinen A, Adamse P, Kendrick RE, Koornneef M** (1989) High Pigment Mutants of Tomato Exhibit High Sensitivity for Phytochrome Action. *J Plant Physiol* **134**: 661–666
- Pfaffl MW** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45
- Pino LE, Lombardi-Crestana S, Azevedo MS, Scotton DC, Borgo L, Quecini V, Figueira A, Peres LE** (2010) The Rg1 allele as a valuable tool for genetic transformation of the tomato “Micro-Tom” model system. *Plant Methods* **6**: 23
- Pnueli L, Carmel-Goren L, Hareven D, Gutfinger T, Alvarez J, Ganai M, Zamir D, Lifschitz E** (1998) The SELF-PRUNING gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of CEN and TFL1. *Development* **125**: 1979–1989
- Poles L, Licciardello C, Distefano G, Nicolosi E, Gentile A, Malfa S La** (2020) Recent Advances of In Vitro Culture for the Application of New Breeding Techniques in Citrus. *Plants* 2020, Vol 9, Page 938 **9**: 938
- Pons E, Alquézar B, Rodríguez A, Martorell P, Genovés S, Ramón D, Rodrigo MJ, Zacarías L, Peña L** (2014) Metabolic engineering of β -carotene in orange fruit increases its in vivo antioxidant properties. *Plant Biotechnol J* **12**: 17–27
- Quian-Ulloa R, Stange C** (2021) Carotenoid Biosynthesis and Plastid Development in Plants: The Role of Light. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol 22, Page 1184 **22**: 1184
- Rai A, Kumari K, Vashistha P** (2022) Umbrella review on chilling injuries: Post-harvest issue, cause, and treatment in tomato. *Sci Hortic* **293**: 110710
- Rani R, Yadav P, Barbadikar KM, Baliyan N, Malhotra EV, Singh BK, Kumar A, Singh D** (2016) CRISPR/Cas9: a promising way to exploit genetic variation in plants. *Biotechnol Lett* **38**: 1991–2006
- Ricroch A, Eriksson D, Miladinović D** (2024) A Roadmap for Plant Genome Editing. A Roadmap for Plant Genome Editing. doi: 10.1007/978-3-031-46150-7/COVER
- Rodrigo M-J, Marcos JF, Alférez F, Mallent MD, Zacarías L** (2003) Characterization of Pinalate, a novel *Citrus sinensis* mutant with a fruit-specific alteration that results in yellow pigmentation and decreased ABA content. *J Exp Bot* **54**: 727–738
- Rodriguez-Concepcion M, Avalos J, Bonet ML, Boronat A, Gomez-Gomez L, Hornero-Mendez D, Limon MC, Meléndez-Martínez AJ, Olmedilla-Alonso B, Palou A, et al** (2018) A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. *Prog Lipid Res* **70**: 62–93
- Rogers HJ, Bate N, Combe J, Sullivan J, Sweetman J, Swan C, Lonsdale DM, Twell D** (2001) Functional analysis of cis-regulatory elements within the promoter of the tobacco late pollen gene g10. *Plant Mol Biol* **45**: 577–585
- Ronen G, Carmel-Goren L, Zamir D, Hirschberg J** (2000) An alternative pathway to beta -carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of beta and old-gold color mutations in tomato. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 11102–7

- Ronen G, Cohen M, Zamir D, Hirschberg J** (1999) Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant Delta. *The Plant Journal* **17**: 341–351
- Rosas-Saavedra C, Stange C** (2016) Biosynthesis of Carotenoids in Plants: Enzymes and Color. pp 35–69
- Rosati C, Aquilani R, Dharmapuri S, Pallara P, Marusic C, Tavazza R, Bouvier F, Camara B, Giuliano G** (2000) Metabolic engineering of beta-carotene and lycopene content in tomato fruit. *Plant J* **24**: 413–9
- Roselló S, Adalid AM, Cebolla-Cornejo J, Nuez F** (2011) Evaluation of the genotype, environment and their interaction on carotenoid and ascorbic acid accumulation in tomato germplasm. *J Sci Food Agric* **91**: 1014–1021
- Rosso SW** (1968) The ultrastructure of chromoplast development in red tomatoes. *J Ultrastruct Res* **25**: 307–322
- Salonia F, Ciacciulli A, Pappalardo HD, Poles L, Pindo M, Larger S, Caruso P, Caruso M, Licciardello C** (2022) A dual sgRNA-directed CRISPR/Cas9 construct for editing the fruit-specific β -cyclase 2 gene in pigmented citrus fruits. *Front Plant Sci* **13**: 975917
- Salonia F, Ciacciulli A, Poles L, Pappalardo HD, La Malfa S, Licciardello C** (2020) New Plant Breeding Techniques in Citrus for the Improvement of Important Agronomic Traits. A Review. *Front Plant Sci* **11**: 565197
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis TA** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Sanfeng L, Lan S, Ping H, Xianmei W, Qiaoling Y, Yuchun R, Qian Q, Kejian W, Xudong Z, Lianguang S, et al** (2020) A Method for Effectively Overcoming Tight Functional Linkage Between Genes in Rice by CRISPR/Cas9 System. *Rice Sci* **27**: 180–183
- Sathasivam R, Radhakrishnan R, Kim JK, Park SU** (2021) An update on biosynthesis and regulation of carotenoids in plants. *South African Journal of Botany* **140**: 290–302
- Sato S, Tabata S, Hirakawa H, Asamizu E, Shirasawa K, Isobe S, Kaneko T, Nakamura Y, Shibata D, Aoki K, et al** (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* **485**: 7400 **485**: 635–641
- Schroeder DF, Gahrtz M, Maxwell BB, Cook RK, Kan JM, Alonso JM, Ecker JR, Chory J** (2002) De-Etiolated 1 and Damaged DNA Binding Protein 1 Interact to Regulate Arabidopsis Photomorphogenesis. *Current Biology* **12**: 1462–1472
- Schweiggert RM, Mezger D, Schimpf F, Steingass CB, Carle R** (2012) Influence of chromoplast morphology on carotenoid bioaccessibility of carrot, mango, papaya, and tomato. *Food Chem* **135**: 2736–2742
- Schweiggert RM, Steingass CB, Heller A, Esquivel P, Carle R** (2011) Characterization of chromoplasts and carotenoids of red- and yellow-fleshed papaya (*Carica papaya* L.). *Planta* **234**: 1031–1044
- Scott JW, Baldwin EA, Klee HJ, Brecht JK, Olson SM, Bartz JA, Sims CA** (2008) Fla. 8153 Hybrid Tomato; Fla. 8059 and Fla. 7907 Breeding Lines. *HortScience* **43**: 2228–2230
- Shan Q, Wang Y, Li J, Zhang Y, Chen K, Liang Z, Zhang K, Liu J, Xi JJ, Qiu J-L, et al** (2013) Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* **31**: 686–688

- Shinozaki Y, Nicolas P, Fernandez-Pozo N, Ma Q, Evanich DJ, Shi Y, Xu Y, Zheng Y, Snyder SI, Martin LBB, et al** (2018) High-resolution spatiotemporal transcriptome mapping of tomato fruit development and ripening. *Nat Commun* **9**: 364
- Silletti MF, Petrozza A, Stigliani AL, Giorio G, Cellini F, D'Ambrosio C, Carriero F** (2013) An increase of lycopene content in tomato fruit is associated with a novel Cyc-B allele isolated through TILLING technology. *Molecular Breeding* **31**: 665–674
- Singh P, Goyal GK** (2008) Dietary Lycopene: Its Properties and Anticarcinogenic Effects. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **7**: 255–270
- Snodderly DM** (1995) Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. *Am J Clin Nutr* **62**: 1448S-1461S
- Stanley L, Yuan Y-W** (2019) Transcriptional Regulation of Carotenoid Biosynthesis in Plants: So Many Regulators, So Little Consensus. *Front Plant Sci* **10**: 1017
- Stauder R, Welsch R, Camagna M, Kohlen W, Balcke GU, Tissier A, Walter MH** (2018) Strigolactone Levels in Dicot Roots Are Determined by an Ancestral Symbiosis-Regulated Clade of the PHYTOENE SYNTHASE Gene Family. *Front Plant Sci* **9**: 255
- Stommel JR** (2006) Genetic enhancement of tomato fruit nutritive value. *In* M Razdan, A Matoo, eds, *Genetic Improvement of Solanaceous Crops Volume 2*. Science Publishers, pp 193–238
- Su H, Wang Y, Xu J, Omar AA, Grosser JW, Calovic M, Zhang L, Feng Y, Vakulskas CA, Wang N** (2023) Generation of the transgene-free canker-resistant *Citrus sinensis* using Cas12a/crRNA ribonucleoprotein in the T0 generation. *Nature Communications* 2023 14:1 **14**: 1–12
- Sun T, Tadmor Y, Li L** (2020a) Pathways for Carotenoid Biosynthesis, Degradation, and Storage. *Methods Mol Biol* **2083**: 3–23
- Sun T, Tadmor Y, Li L** (2020b) Pathways for Carotenoid Biosynthesis, Degradation, and Storage. *In* M Rodríguez-Concepción, R Welsch, eds, *Plant and Food Carotenoids*. Methods in Molecular Biology. Humana, New York, NY, New York; USA, pp 3–23
- Sun T, Yuan H, Cao H, Yazdani M, Tadmor Y, Li L** (2018) Carotenoid Metabolism in Plants: The Role of Plastids. *Mol Plant* **11**: 58–74
- Sutherland GA, Qian P, Hunter CN, Swainsbury DJK, Hitchcock A** (2022) Engineering purple bacterial carotenoid biosynthesis to study the roles of carotenoids in light-harvesting complexes. *Methods Enzymol* **674**: 137–184
- Takemura M, Maoka T, Koyanagi T, Kawase N, Nishida R, Tsuchida T, Hironaka M, Ueda T, Misawa N** (2021) Elucidation of the whole carotenoid biosynthetic pathway of aphids at the gene level and arthropodal food chain involving aphids and the red dragonfly. *BMC Zool* **6**: 1–13
- Tao N, Hu Z, Liu Q, Xu J, Cheng Y, Guo L, Guo W, Deng X** (2007) Expression of phytoene synthase gene (Psy) is enhanced during fruit ripening of Cara Cara navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck). *Plant Cell Rep* **26**: 837–843
- Terao J** (2023) Revisiting carotenoids as dietary antioxidants for human health and disease prevention. *Food Funct* **14**: 7799–7824

- Thomson AE, Tomes ML, Wann E V., McCollum JP, Stoner AK** (1965) Characterization of Crimson Tomato Fruit Color. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* **86**: 610–616
- Tigchelaar EC, Tomes ML** (1974) 'Caro-Rich' Tomato. *HortScience* **9**: 82–82
- Tjaden G, Edwards JW, Coruzzi GM** (1995) Cis elements and trans-acting factors affecting regulation of a nonphotosynthetic light-regulated gene for chloroplast glutamine synthetase. *Plant Physiol* **108**: 1109–1117
- Tomes ML, Quackenbush FW** (1958) Caro-Red, a New Provitamin a Rich Tomato. *Econ Bot* **12**: 256–260
- Torres-Montilla S, Rodriguez-Concepcion M** (2021) Making extra room for carotenoids in plant cells: New opportunities for biofortification. *Prog Lipid Res* **84**: 101128
- Van Tuinen A, Cordonnier-Pratt MM, Pratt LH, Verkerk R, Zabel P, Koornneef M** (1997) The mapping of phytochrome genes and photomorphogenic mutants of tomato. *Theoretical and Applied Genetics* **94**: 115–122
- Ulrich D, Olbricht K** (2011) Fruit Organoleptic Properties and Potential for Their Genetic Improvement. *Breeding for Fruit Quality* 39–59
- Verheul MJ, Slimestad R, Tjøstheim IH** (2015) From Producer to Consumer: Greenhouse Tomato Quality As Affected by Variety, Maturity Stage at Harvest, Transport Conditions, and Supermarket Storage. *J Agric Food Chem* **63**: 5026–5034
- Verlaan MG, Hutton SF, Ibrahim RM, Kormelink R, Visser RGF, Scott JW, Edwards JD, Bai Y** (2013) The Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistance Genes Ty-1 and Ty-3 Are Allelic and Code for DFDGD-Class RNA-Dependent RNA Polymerases. *PLoS Genet* **9**: e1003399
- Wada N, Ueta R, Osakabe Y, Osakabe K** (2020) Precision genome editing in plants: State-of-the-art in CRISPR/Cas9-based genome engineering. *BMC Plant Biol* **20**: 234
- Wang CY** (2010) Approaches to Reduce Chilling Injury of Fruits and Vegetables. *Hortic Rev (Am Soc Hortic Sci)* **63**–95
- Wang L, Baldwin EA, Zhao W, Plotto A, Sun X, Wang Z, Brecht JK, Bai J, Yu Z** (2015) Suppression of volatile production in tomato fruit exposed to chilling temperature and alleviation of chilling injury by a pre-chilling heat treatment. *LWT - Food Science and Technology* **62**: 115–121
- Wang L, Chen S, Peng A, Xie Z, He Y, Zou X** (2019) CRISPR/Cas9-mediated editing of CsWRKY22 reduces susceptibility to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* in Wanjincheng orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *Plant Biotechnol Rep* **13**: 501–510
- Wang P, Wang Y, Wang W, Chen T, Tian S, Qin G** (2020) Ubiquitination of phytoene synthase 1 precursor modulates carotenoid biosynthesis in tomato. *Communications Biology* **2020 3:1 3**: 1–14
- Wang W, Wang P, Li X, Wang Y, Tian S, Qin G** (2021) The transcription factor SIHY5 regulates the ripening of tomato fruit at both the transcriptional and translational levels. *Hortic Res* **8**: 83
- Wang Y, Li J, Yang J, Xia R** (2011) Expression of lycopene cyclase genes and their regulation on downstream carotenoids during fruit maturation of Guoqing No. 1 Satsuma mandarin and Cara Cara navel orange. *Sci Hortic* **127**: 267–274

- Wann E V., Jourdain EL, Pressey R, Lyon BG** (1985) Effect of Mutant Genotypes *hp ogc* and *dg ogc* on Tomato Fruit Quality. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **110**: 212–215
- Watanabe S, Mizoguchi T, Aoki K, Kubo Y, Mori H, Imanishi S, Yamazaki Y, Shibata D, Ezura H** (2007) Ethylmethanesulfonate (EMS) mutagenesis of *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom for large-scale mutant screens. *Plant Biotechnology* **24**: 33–38
- Wei X, Hu H, Tong H, Gmitter FG** (2017) Profiles of gene family members related to carotenoid accumulation in citrus genus. *Journal of Plant Biology* **60**: 1–10
- Weiss T, Wang C, Kang X, Zhao H, Elena Gamo M, Starker CG, Crisp PA, Zhou P, Springer NM, Voytas DF, et al** (2020) Optimization of multiplexed CRISPR/Cas9 system for highly efficient genome editing in *Setaria viridis*. *The Plant Journal* **104**: 828–838
- Welsch R, Zhou X, Yuan H, Álvarez D, Sun T, Schlossarek D, Yang Y, Shen G, Zhang H, Rodriguez-Concepcion M, et al** (2018) Clp Protease and OR Directly Control the Proteostasis of Phytoene Synthase, the Crucial Enzyme for Carotenoid Biosynthesis in Arabidopsis. *Mol Plant* **11**: 149–162
- Wu F, Wessler J, Zilberman D, Russell RM, Chen C, Dubock AC** (2021) Allow Golden Rice to save lives. *Proc Natl Acad Sci U S A* **118**: e2120901118
- Wu GA, Terol J, Ibanez V, López-García A, Pérez-Román E, Borredá C, Domingo C, Tadeo FR, Carbonell-Caballero J, Alonso R, et al** (2018) Genomics of the origin and evolution of Citrus. *Nature* **554**: 311–316
- Wu Y, Yuan Y, Jiang W, Zhang X, Ren S, Wang H, Zhang X, Zhang Y** (2022) Enrichment of health-promoting lutein and zeaxanthin in tomato fruit through metabolic engineering. *Synth Syst Biotechnol* **7**: 1159–1166
- Wurtzel ET** (2019) Changing Form and Function through Carotenoids and Synthetic Biology. *Plant Physiol* **179**: 830–843
- Xu C-J, Fraser PD, Wang W-J, Bramley PM** (2006) Differences in the Carotenoid Content of Ordinary Citrus and Lycopene-Accumulating Mutants. *J Agric Food Chem* **54**: 5474–5481
- Xu Q, Yu K, Zhu A, Ye J, Liu Q, Zhang J, Deng X** (2009) Comparative transcripts profiling reveals new insight into molecular processes regulating lycopene accumulation in a sweet orange (*Citrus sinensis*) red-flesh mutant. *BMC Genomics* **10**: 540
- Yan F, Shi M, He Z, Wu L, Xu X, He M, Chen J, Deng X, Cheng Y, Xu J** (2018) Largely different carotenogenesis in two pummelo fruits with different flesh colors. *PLoS One* **13**: e0200320
- Yang T, Ali M, Lin L, Li P, He H, Zhu Q, Sun C, Wu N, Zhang X, Huang T, et al** (2022) Recoloring tomato fruit by CRISPR/Cas9-mediated multiplex gene editing. *Hortic Res.* doi: 10.1093/HR/UHAC214
- Yazdani M, Sun Z, Yuan H, Zeng S, Thannhauser TW, Vrebalov J, Ma Q, Xu Y, Fei Z, Eck J Van, et al** (2019) Ectopic expression of ORANGE promotes carotenoid accumulation and fruit development in tomato. *Plant Biotechnol J* **17**: 33–49
- Yu Q, Xue F, Li Z, Li X, Ai L, Jin M, Xie M, Yu Y** (2022) Dietary Intake of Carotenoids and Risk of Depressive Symptoms: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Antioxidants* 2022, Vol 11, Page 2205 **11**: 2205

- Yu QH, Wang B, Li N, Tang Y, Yang S, Yang T, Xu J, Guo C, Yan P, Wang Q, et al** (2017) CRISPR/Cas9-induced Targeted Mutagenesis and Gene Replacement to Generate Long-shelf Life Tomato Lines. *Sci Rep* **7**: 11874
- Yuan Y, Ren S, Liu X, Su L, Wu Y, Zhang W, Li Y, Jiang Y, Wang H, Fu R, et al** (2022) SIWRKY35 positively regulates carotenoid biosynthesis by activating the MEP pathway in tomato fruit. *New Phytologist* **234**: 164–178
- Zacarías-García J, Cronje PJ, Diretto G, Zacarías L, Rodrigo MJ** (2022) A comprehensive analysis of carotenoids metabolism in two red-fleshed mutants of Navel and Valencia sweet oranges (*Citrus sinensis*). *Front Plant Sci* **13**: 1034204
- Zacarías-García J, Rey F, Gil JV, Rodrigo MJ, Zacarías L** (2020) Antioxidant capacity in fruit of *Citrus* cultivars with marked differences in pulp coloration: Contribution of carotenoids and vitamin C. <https://doi.org/10.1177/1082013220944018> **27**: 210–222
- Zaman QU, Raza A, Lozano-Juste J, Chao L, Jones MGK, Wang H-F, Varshney RK** (2023) Engineering plants using diverse CRISPR-associated proteins and deregulation of genome-edited crops. *Trends Biotechnol.* doi: 10.1016/J.TIBTECH.2023.10.007
- Zerres S, Stahl W** (2020) Carotenoids in human skin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1865**: 158588
- Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, Volz SE, Joung J, van der Oost J, Regev A, et al** (2015) Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. *Cell* **163**: 759–771
- Zhang F, LeBlanc C, Irish VF, Jacob Y** (2017) Rapid and efficient CRISPR/Cas9 gene editing in *Citrus* using the YAO promoter. *Plant Cell Rep* **36**: 1883–1887
- Zhang J, Tao N, Xu Q, Zhou W, Cao H, Xu J, Deng X** (2009) Functional characterization of *Citrus* PSY gene in Hongkong kumquat (*Fortunella hindsii* Swingle). *Plant Cell Rep* **28**: 1737–1746
- Zhang L, Ma G, Shirai Y, Kato M, Yamawaki K, Ikoma Y, Matsumoto H** (2012a) Expression and functional analysis of two lycopene β -cyclases from citrus fruits. *Planta* **236**: 1315–1325
- Zhang L, Ma G, Shirai Y, Kato M, Yamawaki K, Ikoma Y, Matsumoto H** (2012b) Expression and functional analysis of two lycopene β -cyclases from citrus fruits. *Planta* **236**: 1315–1325
- Zhang S, Zhu H** (2024) Development and prospect of gene-edited fruits and vegetables. *Food Quality and Safety* **8**: 1–15
- Zhang X, Shen L, Li F, Meng D, Sheng J** (2013) Arginase induction by heat treatment contributes to amelioration of chilling injury and activation of antioxidant enzymes in tomato fruit. *Postharvest Biol Technol* **79**: 1–8
- Zhang X, Shen L, Li F, Zhang Y, Meng D, Sheng J** (2010) Up-regulating arginase contributes to amelioration of chilling stress and the antioxidant system in cherry tomato fruits. *J Sci Food Agric* **90**: 2195–2202
- Zhou X, Rao S, Wrightstone E, Sun T, Lui ACW, Welsch R, Li L** (2022) Phytoene Synthase: The Key Rate-Limiting Enzyme of Carotenoid Biosynthesis in Plants. *Front Plant Sci* **13**: 884720
- Zhu H, Li C, Gao C** (2020a) Applications of CRISPR–Cas in agriculture and plant biotechnology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2020 21:11 **21**: 661–677

- Zhu K, Zheng X, Ye J, Jiang Q, Chen H, Mei X, Wurtzel ET, Deng X** (2020b) Building the synthetic biology toolbox with enzyme variants to expand opportunities for biofortification of provitamin a and other health-promoting carotenoids. *J Agric Food Chem* **68**: 12048–12057
- Zoppolo R, Colnago P** (2021) Producción de frutas y hortalizas en Uruguay a la luz del Año Internacional de las Frutas y las Verduras de la FAO. *Agrociencia Uruguay*. doi: 10.31285/AGRO.25.982
- Zsögön A, Čermák T, Naves ER, Notini MM, Edel KH, Weinl S, Freschi L, Voytas DF, Kudla J, Peres LEP** (2018) De novo domestication of wild tomato using genome editing. *Nat Biotechnol* **36**: 1211–1216

9. ANEXO: ARTÍCULO PUBLICADO Y CAPÍTULO DE LIBRO ACEPTADO PARA PUBLICACIÓN

Brief Communication

Targeted disruption of tomato chromoplast-specific lycopene β -cyclase (*CYC-B*) gene promotes early accumulation of lycopene in fruits and enhanced postharvest cold toleranceAna Arruabarrena^{1,*} , Joanna Lado¹, Matías González-Arcos¹ and Sabina Vidal²¹Estación Experimental INIA Salto Grande, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Salto, Uruguay²Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

Received 30 March 2023;

revised 1 August 2023;

accepted 16 August 2023.

*Correspondence (Tel +59 847 335156; Fax +59 847 335156 1600;

email aarruabarrena@inia.org.uy)**Keywords:** CRISPR-Cas9, cold stress tolerance, indeterminate growth habit, high lycopene, genetic linkage, *Solanum lycopersicum*.

Lycopene is a potent antioxidant carotenoid pigment found in tomatoes and other red fruits. In green tissues, lycopene acts as a free-radical scavenger conferring protection during photosynthesis (Khan *et al.*, 2021). High-lycopene tomato genotypes containing knockout mutations within the lycopene catabolic *CYC-B* gene include the spontaneous *old-gold* (*og*) or *old-gold crimson* (*og^c*) mutations, and the chemically-induced mutation A949G (Ronen *et al.*, 2000; Silletti *et al.*, 2012). These mutations only exist in determinate tomatoes harbouring mutant *sp* alleles in the *SELF-PRUNING* (*SP*) locus (Soly06g074350), which controls plant architecture (Pnueli *et al.*, 1998). Most production systems destined for the fresh market, use indeterminate growth habit tomatoes (Peet and Welles, 2005). Genetic variants in the *SP* and *CYC-B* loci are difficult to separate by conventional breeding because of their tight genetic linkage (Figure S1a) (Pnueli *et al.*, 1998). Because of this, tomato breeders have failed to use *og*, *og^c*, and A949G mutants to obtain high-lycopene indeterminate tomatoes.

Here we used CRISPR/Cas9 to generate knockout variants of *CYC-B* (Soly06g074240) in two indeterminate elite tomato genotypes (LT16 and LT46) harbouring wild-type (WT) *SP* alleles (Appendix S1). The resulting *cyc-b* knockout lines exhibited indeterminate growth and increased lycopene content in the fruit, overcoming the existing genetic linkage between these traits.

To disrupt *CYC-B*, two sgRNAs (1 & 2) were designed to target positions 44–63 or 274–293 bp downstream from the ATG codon, respectively (Figures 1a and S1b). SgRNA activity was pre-validated by *in vitro* DNA-cleavage assays using Cas9/gRNAs ribonucleoprotein complexes and *CYC-B* DNA template (Figure S1c). A binary vector containing a polycistronic sgRNA construct and a Cas9 expression cassette was used to transform LT16 and LT46 genotypes. Five knockout alleles for *CYC-B*, harbouring small deletions (1, 2, 4, or 7 bp), or a large deletion (229 bp), were obtained (Figures 1a and S2). All the edited alleles encoded truncated nonfunctional *CYC-B* proteins (Figure 1b). T-

DNA-free homozygous mutants of both genotypes were obtained within the first two generations after plant transformation (Figure 1c; Table S1). LT16-*cycb* Δ 7 line, containing a 7 bp (6 + 1) deletion affecting both sgRNAs targets, lacked off-target mutations in 3 predicted target genes (Figure S3).

Fruit quality parameters (acidity, soluble solids content, and firmness) were similar between LT16-*cycb* Δ 7 and the WT (Table S3), and no developmental alterations were observed in LT16-*cycb* Δ 7. In contrast, the colour of flowers and fruits from the edited line exhibited substantial differences with the WT (Figure 1d). LT16-*cycb* Δ 7 flowers showed tawny orange petals and anthers in contrast to the bright yellow flowers of the WT. External and internal colour indexes (CI) of the fruit were higher in LT16-*cycb* Δ 7, both at Breaker and Red-Ripe stages. The differences in red colour development were more evident in the columella, placenta, and locular tissue.

Interestingly, chromoplasts of the locular tissue of LT16-*cycb* Δ 7 differed substantially from WT chromoplasts. Edited plants contained abundant lycopene-accumulating crystalloid chromoplasts, with more and larger lycopene crystals than the WT. In contrast, WT locular tissue contained mainly round-shaped plastoglobuli-like structures accumulating β -carotene (Figures 1e and S4).

Lycopene accounts for 90% of total carotenoids in Red-Ripe tomatoes, followed by β -carotene, lutein, and phytoene/phytofluene (Ronen *et al.*, 2000). Similar to *og^c* mutants, we found that LT16-*cycb* Δ 7 had higher lycopene and lower β -carotene contents in fruit than the WT, especially in the Breaker stage (Figure 1d; Table S2). These differences were less evident in the pericarp of Red-Ripe tomatoes (Table S2). In addition, fruits from LT16-*cycb* Δ 7 developed a more uniform external and internal red colour and higher CI values compared to the WT during postharvest maturation at 25 °C (Figure 1f), representing a commercial advantage for edited plants because the fresh-market supply chain usually uses fruit harvested at Breaker stage.

Tomato fruit is highly sensitive to chilling injury (ChI) disorder when exposed to low non-freezing temperatures (Rai *et al.*, 2022). ChI is associated with loss of membrane permeability and accumulation of reactive oxygen species (ROS). The protective role of lycopene during chilling stress has been reported in grapefruit peel associated with higher ROS scavenging properties (Lado *et al.*, 2016). Here, we demonstrated that *CYC-B*-edited plants were more tolerant to ChI during postharvest cold storage. When edited and WT fruits were harvested at Breaker stage and stored for 13 days at 5 °C, the percentage of fruits with visible symptoms of ChI was remarkably reduced in LT16-*cycb* Δ 7 (20%), compared to

the WT (63%) (Figure 1g). Moreover, levels of lipid peroxidation of fruit epidermis induced by low-temperature (revealed by Schiff's staining), were evidently lower in LT16-*cycb*Δ7 than in the WT (Figure 1h). These results suggest that early lycopene accumulation

during fruit ripening prevents low-temperature-induced damage to fruits. To our knowledge, this is the first report establishing a direct association between lycopene content and chilling tolerance in tomato.

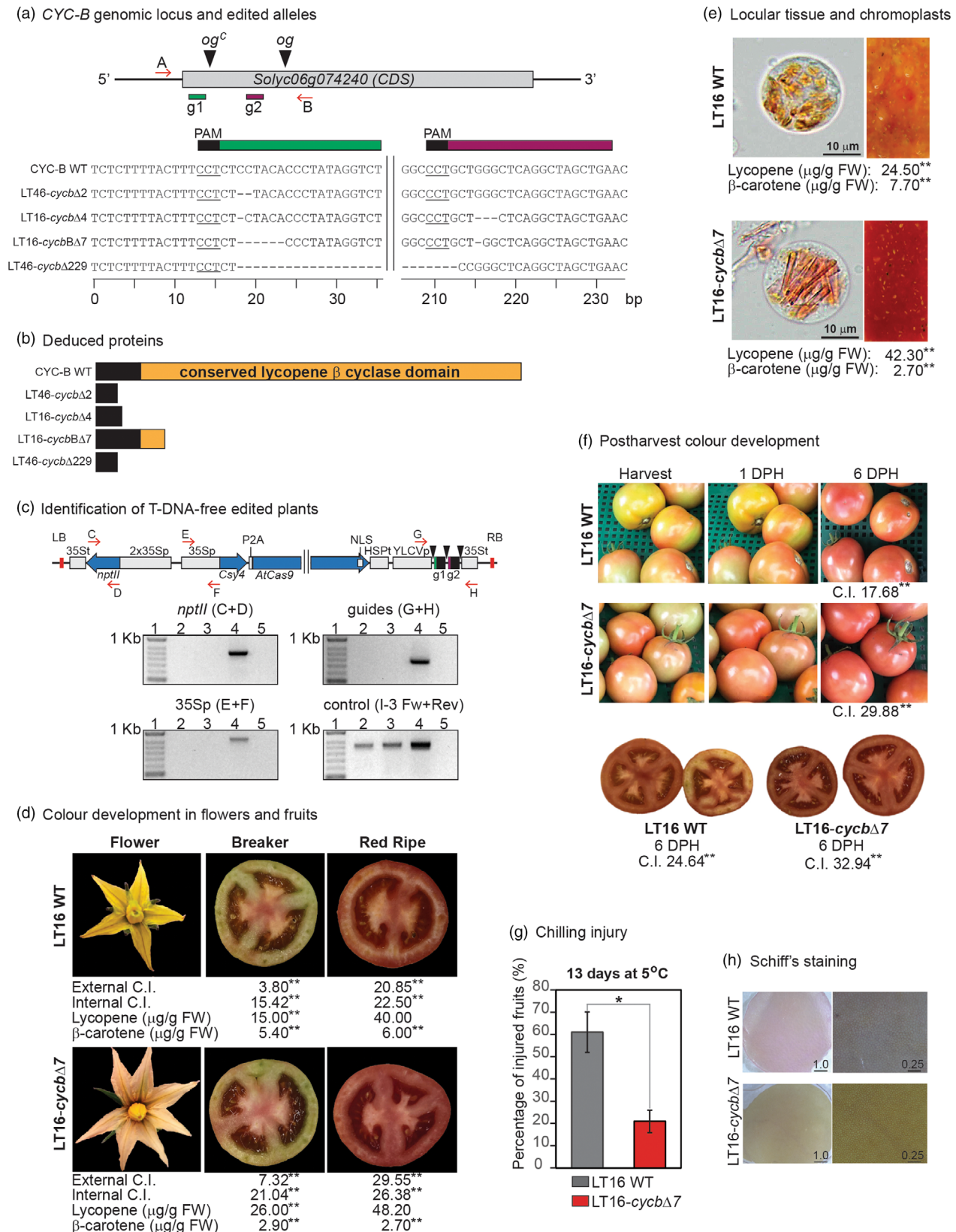


Figure 1 (a) Illustration of *CYC-B* gene and sgRNA target sequences of WT and edited lines. Location of sgRNAs targets (Guide1 green, Guide2 purple), *og^c* and *og* mutations, and primers (A and B) used for mutation screening, are shown. (b) Predicted *CYC-B* proteins from WT and edited alleles. (c) Identification of T-DNA-free edited plants. Primers for PCR amplification of different parts of the gene construct are shown in the T-DNA schematic representation. PCR amplification of *nptII* (primers C + D), 35S promoter (E + F), Guide cassettes (G + H), and tomato *I-3* endogenous control gene (I-3 Fw + Rev), were separated by electrophoresis in agarose gels. Lanes: (1) Hyperladder 50 bp (Meridian), (2) WT, (3) LT16-*cycbΔ7*, (4) LT16-1 T0 transgenic, (5) DNA-free control. (d) Flowers and fruits of LT16-WT and LT16-*cycbΔ7*. Internal and external colour index (C.I.) and lycopene and β-carotene content (μg/g FW) of whole fruit are indicated. (e) Locular tissue and individual cells showing characteristic chromoplasts and lycopene and β-carotene content of LT16-WT and LT16-*cycbΔ7*. (f) Postharvest colour development of Breaker fruit from WT and LT16-*cycbΔ7* stored at 25 °C. DPH: days postharvest. (g) Percentage of Breaker fruit from LT16-WT and LT16-*cycbΔ7* with chilling injury symptoms after 13 days of storage at 5 °C (**P* = 0.0869). (h) Schiff's staining of epidermis discs from LT16-WT and LT16-*cycbΔ7* fruit stored at 5 °C for 19 days. Bars are in millimetres. Analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey's test (**P* < 0.1; ***P* < 0.05) was used for mean comparison between WT and edited line for each developmental stage (d, e, and f). GLMM analysis was used in (g).

Combining genetically linked traits remains a challenge in plant breeding. We used CRISPR/Cas9 to combine, indeterminate growth habit and high lycopene traits without affecting other traits of the elite germplasm. Additionally, we provide direct evidence of the protective role of lycopene during fruit cold storage, reducing Chl symptoms and yielding fresh market tomatoes with higher commercial value.

Author contributions

AA, JL, MGA and SV designed the experiments. AA performed the experiments and wrote the manuscript with contributions from all authors. All authors read and approved the manuscript's final version.

Acknowledgements

The authors thank Biotechnology, Tomato Breeding and Fruit Quality teams for taking care of the tomato plants and fruit quality determinations. Facundo Ibañez for HPLC determinations. Lázaro Peres for providing pDIRECT22C plasmid. Luciana Fleitas for helping with sgRNA's *in vitro* assays.

Competing interests

Authors declare no conflict of interest.

Funding

INIA (L1 HO_20_0_00) and CSIC (CSIC I + D 1492, UdelaR).

References

- Khan, U.M., Sevindik, M., Zarrabi, A., Nami, M., Ozdemir, B., Kaplan, D.N. *et al.* (2021) Lycopene: Food Sources, Biological Activities, and Human Health Benefits. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2021**, 2713511.
- Lado, J., Rodrigo, M.J., López-Climent, M., Gómez-Cadenas, A. and Zacarías, L. (2016) Implication of the antioxidant system in chilling injury tolerance in the red peel of grapefruit. *Postharvest Biol Technol* **111**, 214–223.
- Peet, M.M. and Welles, G. (2005) Greenhouse tomato production. In *Tomatoes*, pp. 257–304. Wallingford: CABI.
- Pnueli, L., Carmel-Goren, L., Hareven, D., Gutfinger, T., Alvarez, J., Ganai, M., Zamir, D. *et al.* (1998) The SELF-PRUNING gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of CENand TFL1. *Development* **125**, 1979–1989.
- Rai, A., Kumari, K. and Vashistha, P. (2022) Umbrella review on chilling injuries: Post-harvest issue, cause, and treatment in tomato. *Sci. Hortic.* **293**, 110710.
- Ronen, G., Carmel-Goren, L., Zamir, D. and Hirschberg, J. (2000) An alternative pathway to beta -carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of beta and old-gold color mutations in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 11102–11107.
- Silletti, M.F., Petrosza, A., Stigliani, A.L., Giorio, G., Cellini, F., D'Ambrosio, C. and Carriero, F. (2012) An increase of lycopene content in tomato fruit is associated with a novel *Cyc-B* allele isolated through TILLING technology. *Mol. Breed.* **31**, 665–674.

Supporting information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Appendix S1 Experimental procedures used in this study.

Appendix S2 Supplementary Figures S1–S4.

Appendix S3 Supplementary Tables.

Supplementary Files 1. Experimental procedures used in this study.

Plant materials and growth conditions.

Tomato (*S. lycopersicum*) elite genotypes with indeterminate growth habit (harboring the *SP* allele) LT16 and LT46 from INIA's breeding program were used for genetic transformation. Tomato seeds were surface-sterilized and sown *in vitro* in half-strength MS medium supplemented with B5 vitamins (Pino et al., 2010) and kept in the dark at 25°C for 7 days. Plantlets were transferred to light (16 h light/8 h dark at 25°C) for two days before cotyledon and/or hypocotyl transformation. Plant regeneration was performed under the same light/dark and temperature conditions. Whole plants were transferred to pots and wrapped in plastic bags for a few days before being transferred to the biosafety greenhouse.

sgRNAs design, in vitro efficiency evaluation and vector construction.

Two sgRNAs targeting the fruit-specific lycopene β -cyclase (*CYC-B*) coding sequence (Solyc06g074240) were identified using CRISPOR software (Haeussler et al., 2016). Both target sites are located near the ATG codon at positions + 41-61 (target 1) and +271-291 (target 2). *In vitro* efficiency of both sgRNAs was evaluated on a 3000 bp genomic region that was PCR amplified using primers Gen1 & Gen2 (Supplementary Table S1) that contains both target sites as described in Fleitas et. al, 2022 (Fleitas et al., 2022). The sgRNAs were cloned into the binary vector pDIRECT22C (Čermák et al., 2017) via Golden Gate. The resulting construct (Cas9-SlCYC-B-271-41) was introduced into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 and used for plant transformation.

Plant transformation.

LT16 or LT46 tomato plants were transformed as described by Pino et al. (2010) with some modifications. Briefly, cotyledon and/or hypocotyl segments of approximately 0.5 cm from 9 days old plants were transferred to 50 mL of liquid MS medium supplemented with 1mg/L of zeatin riboside (Duchefa Biochemie) and incubated in the growth chamber with mild agitation for 24 hours. Next, the liquid medium was removed, and explants were incubated for 20 min at 25°C in the dark at 80rpm with an *A. tumefaciens* suspension in liquid MS (OD_{600} = 0.3-0.4) pretreated for 25 min with 100 μ M acetosyringone (Sigma-Aldrich). The bacterial suspension was removed, and explants were blotted on sterile filter paper, placed on semi-solid MS supplemented with 100 μ M acetosyringone and 1 mg/L of zeatin riboside, and co-incubated at 25°C in the dark for 24 h. Explants were transferred to selective MS media containing 50 μ g/mL kanamycin (PhytoTech Labs) and 250 μ g/mL timentin (PhytoTech Labs). Living explants were subcultured every 4 weeks until complete kanamycin-resistant plants were regenerated.

Detection of mutations of the CYC-B gene in T0 and T1 progeny.

Tomato genomic DNA was extracted from the leaves of T0 and T1 plants using the sodium citrate method (Arruabarrena et al., 2016) and was used for PCR amplification of the target locus. For the identification of targeted mutations within *CYC-B* in T0 plants, genomic DNA was PCR-amplified with primers A and B coupled with the 5'FAM-m13fw primer, and PCR products were analyzed by high-resolution fragment analysis (HRFA) as described in Andersson et al., 2017 (Figure 1B and Supplementary Table S1)(Andersson et al., 2017; Boutin-Ganache et al., 2001). The amplicon (580 bp plus 19 bp from the m13 tail of the forward primer) included the 5'UTR region and the first part of the coding sequence containing both sgRNA targets (positions -56 to + 524 bp).

Mutations in the genomic sequence were then confirmed by sequencing the PCR products amplified from genomic DNA of HRFA-confirmed edited events, using primers A and B. Amplicon sequence was determined for the LT46-3 mutant in the T0 generation and for homozygous LT16-1 and LT46-10 mutant lines in the T1 generation.

Selection of T-DNA-free plants and off-target mutations analysis.

T0 plants were screened for T-DNA presence/absence by amplifying three different T-DNA regions: the *nptII* gene, 35S promoter, and sgRNAs cassette using primers C+D, E+F, and G+H, respectively (Figure 2a and Supplementary Table S1). Primers I-3 Fw+Rev (Supplementary Table S1) for amplification of the *I-3* locus (Soly07g055640), an endogenous tomato gene, were also used as PCR amplification control (Barillas et al., 2008). T1 and T2 progeny lines were screened for the presence or absence of T-DNA by amplifying the sgRNAs cassette and endogenous control in a multiplex PCR reaction using the NucleoType Plant PCR Kit (Macherey-Nagel, Germany). PCR conditions were as follows: 100-200 ng of DNA, 1x Mango mix (Bioline, Meridian Bioscience, USA), 0.25 μ M of each primer, and PCR-grade water up to a volume of 20 μ L. Cycling conditions were 95°C for 3 min, followed by 35 cycles of 95°C for 30s, 59°C (C+D), or 52°C (E+F, G+H, I-3 Fw+Rev) for 30s and 72°C for 30s and a final extension step at 72°C for 60s.

T1 and T2 plants with negative PCR amplification for the sgRNAs cassette were subsequently screened for the *nptII* gene and 35S promoter and were considered T-DNA-free when PCR was negative for the three different T-DNA regions.

The selected non-transgenic plants were analyzed for the presence of off-target mutations within the candidate genes predicted by CRISPOR (Soly01g008780, Soly02g078750, and Soly09g083050). The three *loci* were amplified by PCR using the primers listed in Supplementary Table S1. The PCR products were sequenced using the Sanger method and compared to the wild-type sequences of each locus.

Determination of fruit quality traits and lycopene and β -carotene contents.

Experimental design

For fruit characterization, plants were grown in 10 L pots in a biosafety greenhouse during the autumn of 2022. The experimental design consisted of two blocks with two replicates for each genotype (WT and LT16-*cycb* Δ 7). Each replicate consisted of 10 plants. Breaker and Red Ripe fruits were harvested from each replicate on the same day and immediately processed.

For cold storage assays plants were grown in 10 L pots in a biosafety greenhouse during the autumn of 2023. The experimental design consisted of four blocks with one replicate for each genotype (WT and LT16-*cycb* Δ 7). Each replicate consisted of 8 plants. Breaker fruits were harvested from each replicate on the same day and immediately processed.

Flower and fruit phenotype observation

Flowers and fruits from both genotypes were observed during the plants life cycles and documented using a digital camera.

For microscopic observations, fruit from both genotypes was harvested at the Mature Green ripening stage and left at 25°C until uniform external red color was achieved. Seed and locular tissue were sampled and pooled together from five fruit/replicate/genotype. Seeds were separated from the locular tissue using a household sieve, and 20 μ L of the locular tissue suspension were placed on a glass slide and covered with a coverslip. Images were acquired using a Nikon Digital Slight 1000 camera coupled to an Olympus BH-2 light microscope.

Fruit quality traits determination

The fruit was harvested at two ripening stages: Breaker and Red Ripe. The external and internal color of 10 fruit/replicate/genotype were measured using a colorimeter CR-400 (Konica Minolta

Optics, Inc. Japan). Measurements were taken at three locations around the equatorial plane of the fruit using the CIE 1976 L*a*b* color space. Color values were expressed as the Yeatman-modified index (ICm) $ICm = 2000 \times a^*/L^* \times (a^{*2} + b^{*2})^{0.5}$ (Gómez & Camelo, 2002). The juice from 10 fruits of each genotype and ripening stage was obtained using a household electric juice extractor and immediately analyzed. Acidity was determined by titration with 0.1 N NaOH. The soluble solid content (°Brix) was determined using a digital refractometer (DBX-55, ATAGO Co., Ltd., Japan). Fruit firmness was determined using a texture analyzer (TA-XT plus, Stable Micro Systems, London, UK). Ten individual fruits per replicate were used, and fruit deformation (mm) was quantified using a 7.5 cm diameter compression plate by applying a force of 10 N and a compression rate of 0.5 mm.s⁻¹.

Lycopene and β-carotene content determinations

Tissue samples from different parts of 10 fruits [Seeds and Locular tissue (S+L), Pericarp (P), and Columella and Placenta (C+PI)] as well as whole fruit were collected at the Breaker and Red Ripe ripening stages, frozen and ground using liquid nitrogen, and stored at -80°C until further analysis.

Carotenoid extracts were prepared using 0.2 g of frozen ground tissue and 1.7 ml of hexane:acetone:ethanol (50:25:25) with 0.1% w/v butylated hydroxytoluene. The tissue was homogenized using a tissue disruptor (Bead Genie, SI-B102, Scientific Industries) with 3 metallic 2.5 mm balls for 30 s. The mixture was centrifuged for 3 min at 7500 × g at 4°C. The colored upper phase was filtered (0.22µm) and transferred to amber glass vials for HPLC analysis. The entire process was performed on ice under low-light conditions.

A Shimadzu liquid chromatography system equipped with an LC-20AT pump, SIL-20AHT autosampler, CTO-10ASVP Column Oven thermostat, DGU-20A5 Degasser, and an SPD-M20A Diode Array Detector was used. Carotenoid extract (10 µL) was injected, and pigments were separated by HPLC using a C8 column (150 mm × 4.6 mm, 5 µm pore size) (Rigel™) with methanol:acetonitrile:triethylamine (90:9:1) as the eluent in a 5.5-minute run using 0.8 mL/min of isocratic flow and 30°C in the column oven. Lycopene and β-carotene were identified by their retention times and absorption spectra and quantified using calibration curves for lycopene (Extrasynthese) and β-carotene (Extrasynthese) standards. Data were analyzed using Shimadzu's LabSolutions software.

Fruit postharvest color development and cold storage

Fruits harvested from wild-type (n=11) and LT16-cycbΔ7 (n=24) genotypes at the Breaker ripening stage were kept at 25°C for six days with natural lightning. External color changes were documented daily. External and internal color were measured 6 days post-harvest (DPH), as described in the section 'Fruit quality traits determination'.

Fruit harvested from wild type and LT16-cycbΔ7 genotypes at Breaker developmental stages were stored at 5°C and 95% RH for 13 days. Chilling injury symptoms (brown depressed spots, dehydration, and rotting) were recorded after 13 days of cold storage and expressed as the average proportion of fruit with symptoms (incidence) (Min et al., 2018). Four replicates of 10 fruits per genotype were used in this experiment.

Histochemical detection of malondialdehyde (MDA) using Schiff's reagent

Epidermis discs from fruits stored at 5°C and 95% RH for 13 days were excised using a 7mm puncher and tweezers. Ten discs per genotype were completely immersed into Schiff's Reagent (Sigma) for 60 minutes at room temperature. Bleaching was performed by immersing the epidermis discs in boiling ethanol 3-4 times until the ethanol remained uncolored (Chen et al., 2023). Epidermis discs were documented using a Nikon Digital Slight 1000 camera coupled to a Nikon SMZ800N stereo microscope. A more intense pink coloration indicates higher MDA content and thus lipid peroxidation in the tissue.

Statistical analysis

A Chi-squared test was applied to verify the goodness-of-fit between observed and expected Mendelian segregation models across the LT16-1 T1 progeny. The mean $\pm$ standard errors (SE) are shown in Table 1. Analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey's test (* $p < 0.1$; ** $p < 0.05$) was used for mean comparison.

A generalized linear mixed model (GLMM) was applied assuming binomial distribution for chilling injury incidence data analysis. Root square was used for variable transformation and normal distribution was checked before variance analysis.

Supplementary Table M1. Primers used in this work.

Primer name	Target region	Primer sequence (5' $\rightarrow$ 3')	Reference
A	CYC-B CDS	<u>CACGACGTTGTAAAACGAC</u> TACAAGTTCCACCTCCCTCCA	this work
B	CYC-B CDS	TTCAACAATTTCAACTTCAGCTTCT	this work
C	nptII CDS	GAGGCTATTCGGCTATGACTGG	Pino et al., 2010
D	nptII CDS	ATCGGGAGCGGCGATACCGTA	Pino et al., 2010
E	35S promoter	AGATTTGCCTTTTCAATTTAGAA	Cermak et al., 2017
F	35S promoter	AGTCCCCCGTGTCTCTCCA	Cermak et al., 2017
G	sgRNAs cassette	CTAGAAGTAGTCAAGGCGGC	Cermak et al., 2017
H	sgRNAs cassette	GTAAAACGACGGCCAGT	Cermak et al., 2017
I-3 Fw	I-3 locus	CAGTCATTATTAACAAATTCAGGATCG	Barillas et al., 2008
I-3 Rev	I-3 locus	TCTGAGCAATACGTCTAGCAGC	Barillas et al., 2008
5'FAM-m13Fw	----	CACGACGTTGTAAAACGAC	Boutin-Ganache et al., 2001
Gen1	CYC-B genomic	TTGCGGAGGCATCACTCTAC	this work
Gen2	CYC-B genomic	TGCGTACTTTCTCCCGTTCC	this work
Off-target primers			
Solyc09g083050-F		TGCACACCACACAGCACTAT	CRISPOR
Solyc09g083050-R		ATCGTCCGATCGAAAGCGTT	CRISPOR
Solyc01g008780-F		GGTGGTTACTCACGTTATGCC	CRISPOR
Solyc01g008780-R		CCGGGCTCAAGTAACACGTA	CRISPOR
Solyc02g078750.2_F		TGTGGAAACCACCACAGAA	this work
Solyc02g078750.2_R		ATGGGGCAGCACTCAATGC	this work

Accession numbers

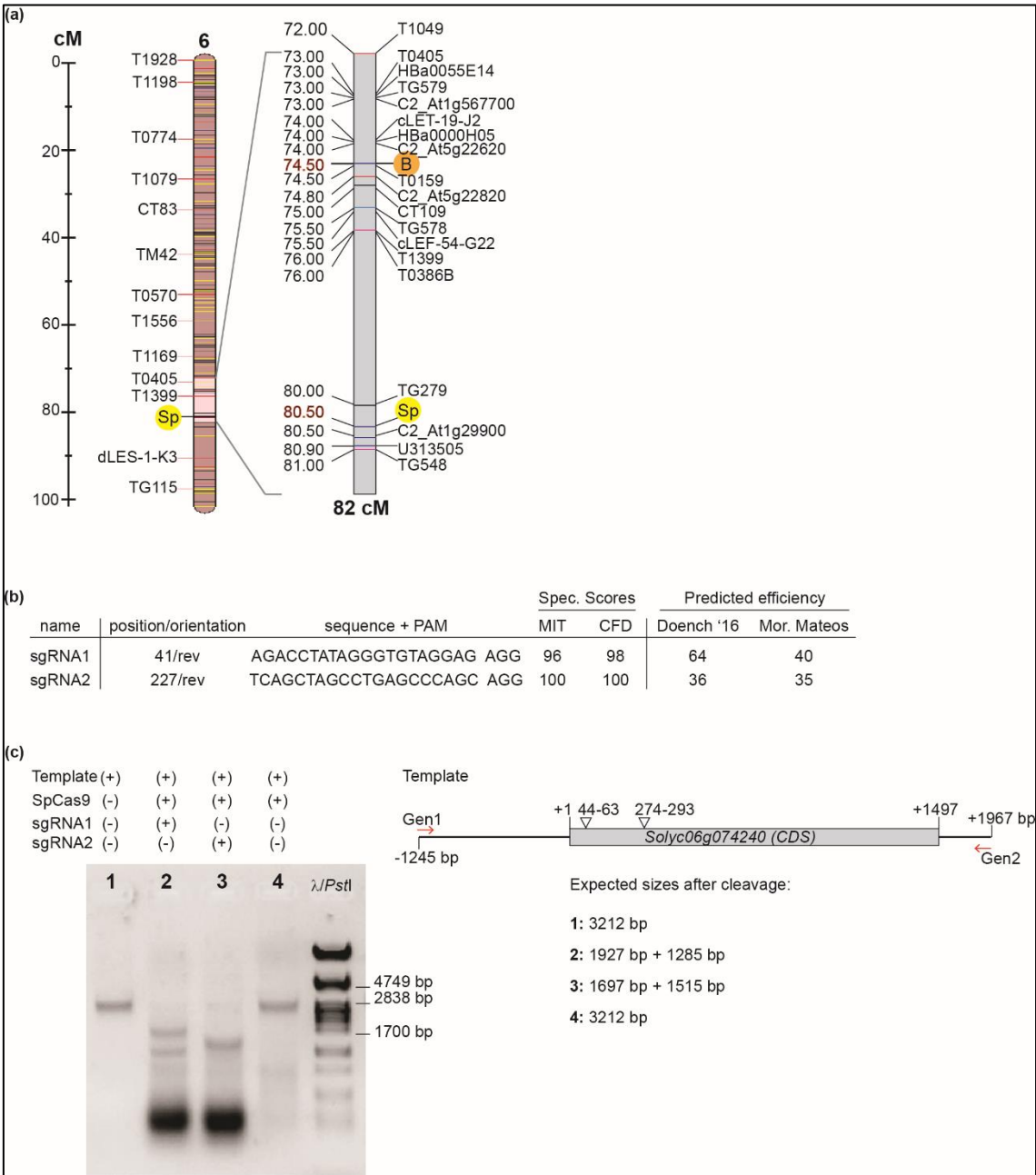
Accession numbers from www.solgenomics.net:

Solyc06g074350 (*SELF-PRUNING* locus), Solyc06g074240 (*Beta* or *Betacarotene* locus; *CYC-B* gene), Solyc04g040190 (*Lycopene β cyclase 1* locus, *CRTL1/LYCB-1*), Solyc10g079480 (*Lycopene β cyclase 2* locus, *LYCB-2*), Solyc12g08980 (*Lycopene ϵ cyclase* locus, *CrtL-e/LCY- ϵ*). Solyc07g055640 corresponds to *I-3* locus. Predicted off-target potential sites loci: Solyc01g008780, Solyc09g083050, and Solyc02g078750.

References of Experimental Procedures

- Andersson, M., Turesson, H., Nicolai, A., Fält, A. S., Samuelsson, M., & Hofvander, P. (2017). Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. *Plant Cell Reports*, 36(1), 117–128. <https://doi.org/10.1007/S00299-016-2062-3>
- Arruabarrena, A., Benítez-Galeano, M. J., Giambiasi, M., Bertalmío, A., Colina, R., & Hernández-Rodríguez, L. (2016). Application of a simple and affordable protocol for isolating plant total nucleic acids for RNA and DNA virus detection. *Journal of Virological Methods*, 237, 14–17. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.08.011>
- Barillas, A. C., Mejia, L., Sanchez-Perez, A., & Maxwell, D. P. (2008). CAPS and SCAR markers for detection of I-3 gene introgression for resistance to *Fusarium oxysporium* f.sp. *lycopersici* race 3. In *Tomato Genetics Coop. Rept.* (Vol. 58).
- Boutin-Ganache, I., Raposo, M., Raymond, M., & Deschepper, C. F. (2001). M13-Tailed Primers Improve the Readability and Usability of Microsatellite Analyses Performed with Two Different Allele-Sizing Methods. *BioTechniques*, 31(1), 24–28. <https://doi.org/10.2144/01311BM02>
- Čermák, T., Curtin, S. J., Gil-Humanes, J., Čegan, R., Kono, T. J. Y. Y., Konečná, E., Belanto, J. J., Starker, C. G., Mathre, J. W., Greenstein, R. L., & Voytas, D. F. (2017). A Multipurpose Toolkit to Enable Advanced Genome Engineering in Plants. *The Plant Cell*, 29(6), 1196–1217. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00922>
- Chen, X., Han, H., Cong, Y., Li, X., Zhang, W., Wan, W., Cui, J., Xu, W., Diao, M., & Liu, H. (2023). The Protective Effect of Exogenous Ascorbic Acid on Photosystem Inhibition of Tomato Seedlings Induced by Salt Stress. *Plants*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/plants12061379>
- Fleitas, A. L., Señorale, M., & Vidal, S. (2022). A Robust Expression and Purification Method for Production of SpCas9-GFP-MBP Fusion Protein for In Vitro Applications. *Methods and Protocols* 2022, Vol. 5, Page 44, 5(3), 44. <https://doi.org/10.3390/MPS5030044>
- Gómez, P. A., & Camelo, A. F. L. (2002). Calidad postcosecha de tomates almacenados en atmósferas controladas. *Horticultura Brasileira*, 20(1), 38–43. <https://doi.org/10.1590/s0102-05362002000100007>
- Haeussler, M., Schönig, K., Eckert, H., Eschstruth, A., Mianné, J., Renaud, J.-B., Schneider-Maunoury, S., Shkumatava, A., Teboul, L., Kent, J., Joly, J.-S., & Concordet, J.-P. (2016). Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. *Genome Biology*, 17(1), 148. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1012-2>
- Min, D., Li, F., Zhang, X., Cui, X., Shu, P., Dong, L., & Ren, C. (2018). SIMYC2 Involved in Methyl Jasmonate-Induced Tomato Fruit Chilling Tolerance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(12), 3110–3117. https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.8B00299/SUPPL_FILE/JF8B00299_SI_001.PDF
- Pino, L. E., Lombardi-Crestana, S., Azevedo, M. S., Scotton, D. C., Borgo, L., Quecini, V., Figueira, A., & Peres, L. E. (2010). The Rg1 allele as a valuable tool for genetic transformation of the tomato “Micro-Tom” model system. *Plant Methods*, 6(1), 23. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-6-23>

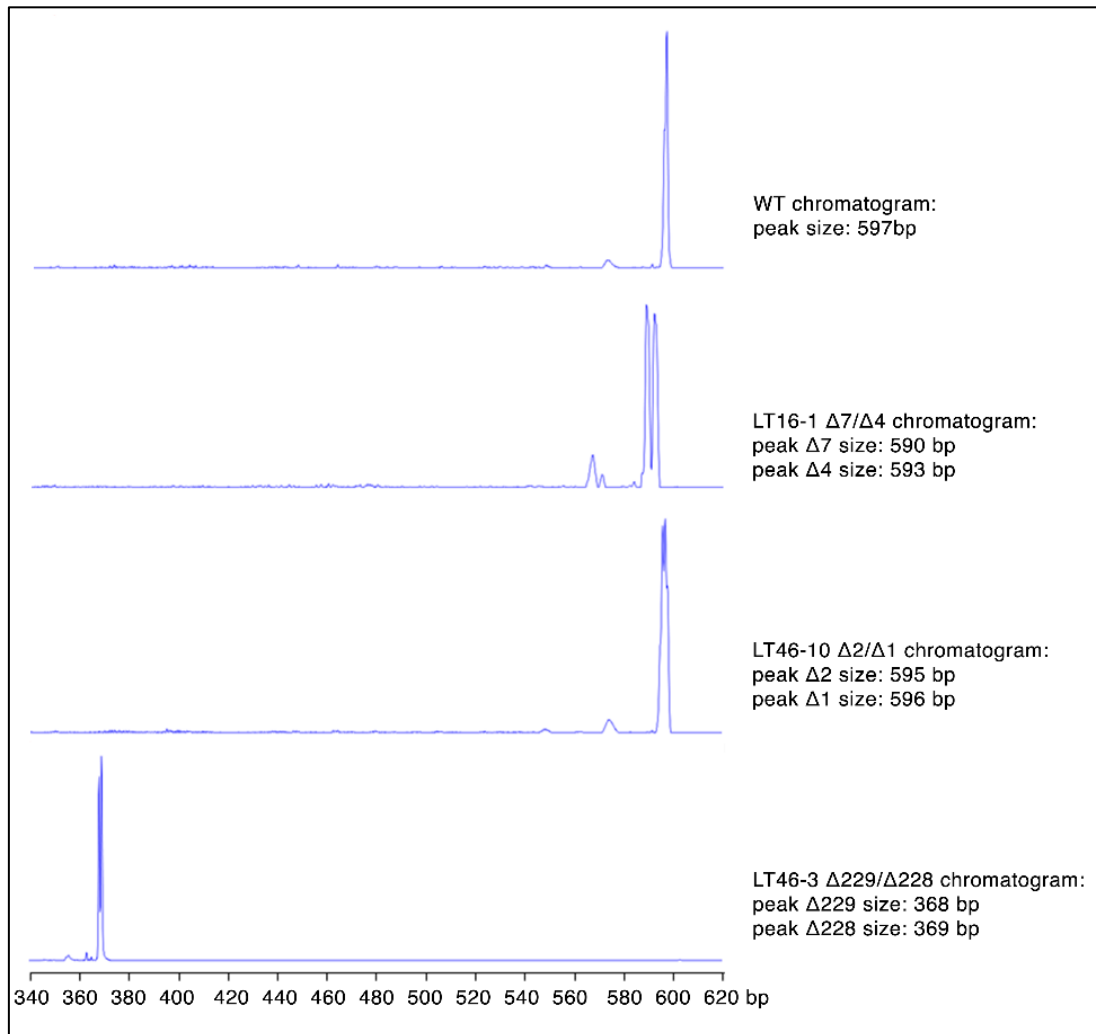
Supplementary Figures S1-S4



Supplementary Figure S1. SgRNA design and *in vitro* DNA cleavage assay for determination of sgRNA activity.

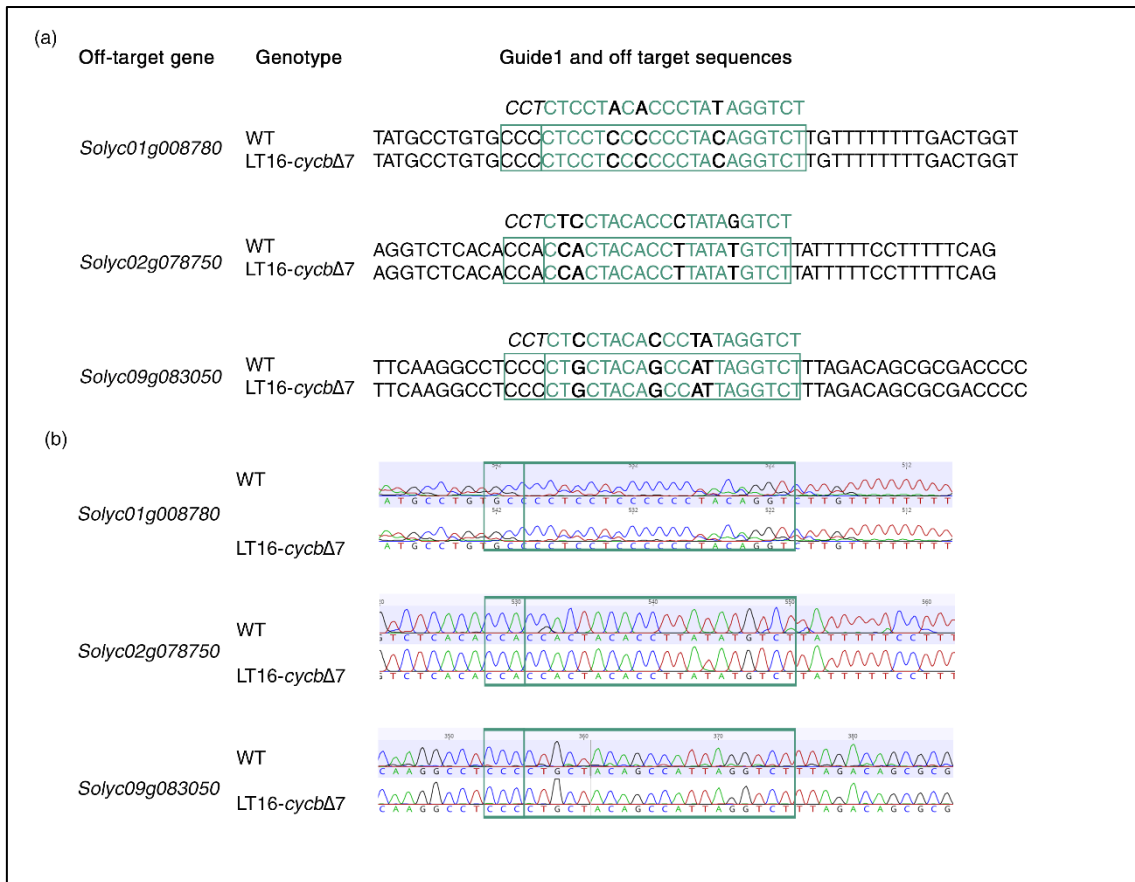
(a) Tomato EXPEN 2000 Chromosome 6 map diagram (www.solgenomics.net). *Sp* and *B* (*CYC-B*) loci are highlighted in yellow and their positions in chromosome 6 are indicated in red. (b) Single guide RNAs (sgRNA) sequences and predicted scores using CRISPOR software (<http://crispor.tefor.net/>). (c) *In vitro* activity of sgRNA1 & sgRNA2. A 3200 bp amplicon including the genomic sequence of *CYC-B* was incubated at 37°C for 3 hours alone (lane 1) or in combination with SpCas9 + sgRNA1 (lane 2), spCas9 +sgRNA2 (lane 3), spCas9 alone (lane 4). Lane 5 corresponds to DNA Ladder (λ/PstI). Efficient cleavage was observed when the amplicon template was incubated with SpCas9 together with either of the two sgRNAs. No SpCas9 cleavage activity was detected when SpCas9 was incubated together with the DNA template, in

the absence of sgRNAs. Amplicon bands after cleavage correspond to 1927 and 1285 bp for sgRNA1 and 1697 and 1515 bp for sgRNA2. SpCas9 was produced and purified for these studies, according to Fleitas *et al.* (2022).



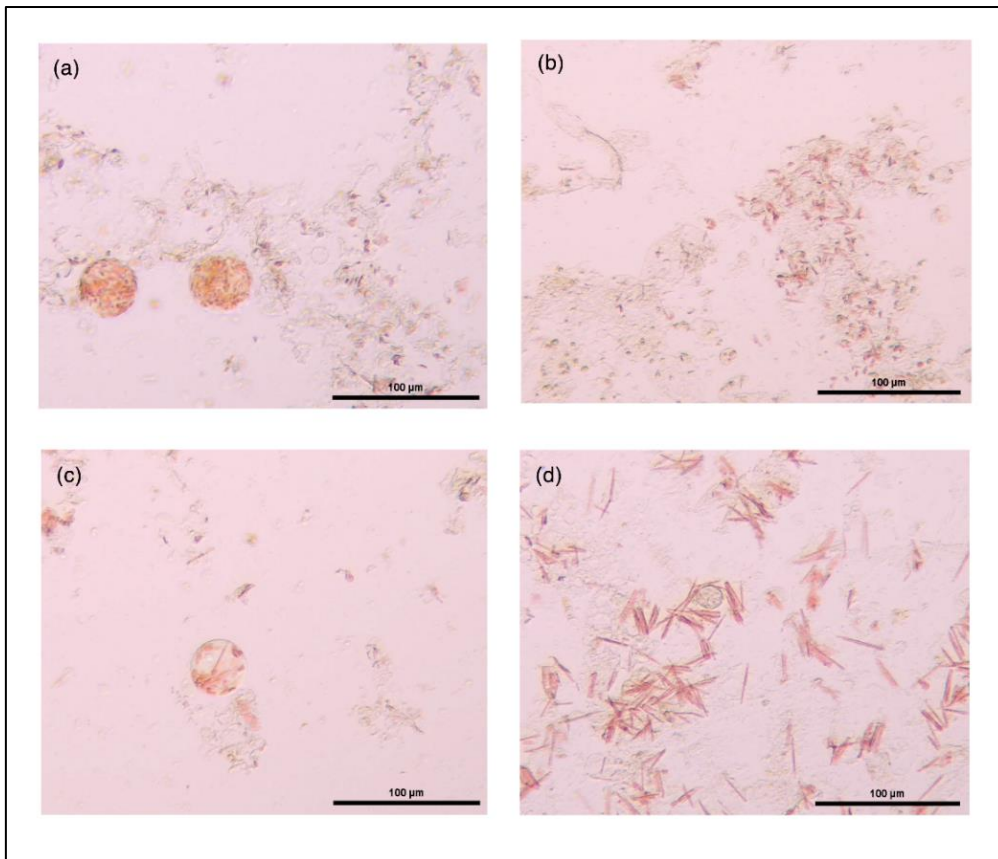
Supplementary Figure S2. High-Resolution Fragment Analysis of T0 plants for identification of CYC-B mutants.

Chromatograms of PCR amplicons including sgRNA1 and sgRNA2 target sequences are shown for WT plants and different edited events: LT16-1, LT46-10 and LT46-3. Genomic DNA was extracted from T0 plants and used for these studies. LT16-1 and LT46-10 are heterozygous for mutant alleles ($\Delta 4/\Delta 7$ and $\Delta 1/\Delta 2$, respectively) and LT46-3 shows a large deletion of 229/228 bp.



Supplementary Figure S3. Analysis of off-target mutations in LT16-*cycb*Δ7.

(a) DNA sequence of predicted putative off-target cleavage sites for genes *Solyc01g008780*, *Solyc09g083050*, and *Solyc02g078750* of LT16-*cycb*Δ7 TDNA-free mutant line compared with LT16-WT sequence. Differences between the sgRNA sequence and the predicted off-target site in three different genes are shown in black (bold). (b) Corresponding Sanger chromatograms for sequences are shown in (a).



Supplementary Figure S4. Panoramic view of microscopic images (10x) of ocular tissue from WT and LT16-*cycb*Δ7 edited line.

(a) and (b) correspond to WT. (c) and (d) correspond to LT16-*cycb*Δ7 mutant. Auto contrast was performed in all photographs.

Supplementary Tables

Supplementary Table S1. Editing efficiency and segregation of edited alleles and T-DNA.

Transformed genotype	LT16	LT46
Editing efficiency	0.071	0.086

Genotype	LT16 <i>cycbΔ4</i> / <i>cycbΔ4</i>	LT16 <i>cycbΔ4</i> / <i>cycbΔ7</i>	LT16 <i>cycbΔ7</i> / <i>cycbΔ7</i>
Segregation of <i>cycbΔ7</i> and <i>cycbΔ4</i> mutant alleles in LT16-1 T1 progeny (# of plants /# of screened T1 plants).	16/61	26/61	19/61
Number of T-DNA free homozygous mutant plants (T1 T-DNA-free/screened).	0/16	-/-	1/19
Number of T-DNA free homozygous mutant plants (T2 T-DNA-free/screened).	7/49	-/-	5/24

Supplementary Table S2. Lycopene and β -carotene concentration in different tissues of Breaker and Red Ripe fruit.

Fruit part	Seeds + Locular tissue (S+L)		Columella + placenta (C+Pl)		Pericarp (P)		Whole fruit (WF)	
Plant line	WT	LT16-<i>cycbΔ7</i>	WT	LT16-<i>cycbΔ7</i>	WT	LT16-<i>cycbΔ7</i>	WT	LT16-<i>cycbΔ7</i>
Breaker Stage								
Lycopene	19,3 ± 3,4**	34,5 ± 2,3**	16,6 ± 1,8**	27,6 ± 1,5**	16,9 ± 3,3	24,8 ± 2,8	15,0 ± 1,6**	26,3 ± 1,8**
β -Carotene	8,7 ± 0,4**	3,2 ± 0,1**	4,5 ± 0,4**	1,4 ± 0,2**	4,6 ± 0,3**	3,4 ± 0,2**	5,4 ± 0,3**	2,9 ± 0,2**
Red Ripe Stage								
Lycopene	24,5 ± 4,0**	42,3 ± 4,1**	28,4 ± 2,4*	37,0 ± 3,5*	51,7 ± 7,8	52,9 ± 5,7	40 ± 5,3	48,2 ± 4,6
β -Carotene	7,7 ± 0,6**	2,7 ± 0,1**	4,9 ± 0,3**	1,0 ± 0,1**	5,6 ± 0,6**	3,2 ± 0,4**	6,0 ± 0,4**	2,7 ± 0,3**

LT16 wild type (WT) and edited line (LT16-*cycbΔ7*). Values are mean $\pm$ SE and expressed in μ g/gFW. One asterisk indicates means are significantly different between WT and LT16-*cycbΔ7* at $p < 0.1$ and two asterisks at $p < 0.05$ according to the Tukey test.

Supplementary Table S3. Fruit quality traits determined for WT and LT16-*cycb*Δ7 genotypes at Breaker and Red Ripe fruit maturity stages.

Maturity stage	Breaker		Red Ripe	
Genotype	WT	LT16- <i>cycb</i> Δ7	wt	LT16- <i>cycb</i> Δ7
Titrateable acidity (%)	0,20 ± 0,00	0,21 ± 0,01	0,21 ± 0,00	0,21 ± 0,01
Soluble solids content (°Brix)	3,51 ± 0,11	3,52 ± 0,06	3,48 ± 0,19	3,71 ± 0,12
Firmness (fruit deformation, mm)	1,6 ± 0,04	1,4 ± 0,11	2,4 ± 0,37	2,0 ± 0,34

Values are mean ±SE, n=10.

Libro: *Agrobacterium*, Methods and Protocols, Capitulo 12: *Agrobacterium*-mediated transformation for gene editing tomato elite breeding lines; ISBN: 978-1-0716-4449-2, Editorial: Springer Nature (ACEPTADO)

COVER PAGE

Corresponding author:

Ana Arruabarrena

Estación Experimental INIA Salto Grande, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
aarruabarrena@inia.org.uy

Chapter Title:

Agrobacterium-mediated transformation for gene editing tomato elite breeding lines

Authors:

Ana Arruabarrena and Sabina Vidal

Running Head:

Agrobacterium mediated editing of tomato elite lines

***Agrobacterium*-mediated transformation for gene editing tomato elite breeding lines**

Ana Arruabarrena^{1,*} and Sabina Vidal²

¹Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Estación Experimental INIA Salto Grande, Camino al Terrible s/n, Salto, Uruguay.

²Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, Montevideo, Uruguay.

*Corresponding author: Ana Arruabarrena (aarruabarrena@inia.org.uy)

ABSTRACT:

Genome editing success in crop species is largely dependent on the availability of highly efficient plant transformation protocols. Tomato (*Solanum lycopersicum*) was the first dicotyledonous crop to be successfully mutagenized using CRISPR-Cas9. Despite many efforts, no standardized, simple protocol is available for non-model tomato genotypes. With the increasing availability of gene editing tools, the transformation of elite tomato breeding lines has gained importance because mutant variants can be easily incorporated into breeding programs. This chapter describes a protocol for transforming and gene editing in elite tomato breeding lines, reaching 3.6% of transformation efficiency.

Keywords: *Solanum lycopersicum*, hypocotyl, *Agrobacterium tumefaciens*, CRISPR-Cas9

1. INTRODUCTION.

Tomato (*Solanum lycopersicum*) is an important fruit crop and a plant model for genetic analysis and studying climacteric fruit ripening processes [1, 2]. It was the first dicotyledonous crop species to be successfully mutagenized using CRISPR-Cas9 in 2014 [3]. However, tomato's ability to successfully undergo *in vitro* tissue culture transformation and regeneration depends largely on the genotype, explant type, carbon source, *Agrobacterium tumefaciens* strain, and plant growth regulators used in the medium [4–6]. Most utilized protocols have been developed for model genotypes such as M82, Alisa Craig, Moneymaker, and MicroTom [7–11], but these protocols are less efficient in cultivated and commercial genotypes.

With the increasing availability of gene-editing tools for developing novel genetic variants in plants, the transformation of elite tomato breeding lines has gained importance because mutant variants can be easily incorporated into breeding programs to develop commercial cultivars. This chapter describes a protocol suitable for transforming and gene editing elite tomato breeding lines using a single plant growth regulator throughout the entire procedure. The protocol was successfully implemented to transform and generate knockout mutants of the *CYC-B* gene in two elite breeding lines (LT16 and LT46) from the INIA Uruguay tomato breeding program [12]. The transformation efficiencies ranged from 0.13% to 3.0% for LT16 and 0.75% to 3.6% for LT46 (*see Note 1*).

2. MATERIALS

All glassware, tweezers, scalpels, and strainers must be sterilized. Plastic Petri dishes sterilized by Gamma radiation are preferred over Petri dishes sterilized by other methods. All solutions should be prepared using ultrapure milli-Q water (18.2 MΩ·cm), and molecular biology grade reagents, unless otherwise indicated.

2.1 Antibiotic and hormone stock solutions

1. Prepare Timentin at a concentration of 250 mg/mL (TIM), Kanamycin at 50 mg/mL (KAN), and Spectinomycin at 50 mg/mL (SP) by dissolving the appropriate amounts in milli-Q water. Filter-sterilize the resulting solutions using 0.22 μ m cellulose acetate membrane syringe filters. For Rifampicin at 25 mg/mL (RIF), dissolve the appropriate amount in DMSO and store at -20 °C protected from the light. No sterilization is needed.
2. Prepare 1 mg/mL *trans*-Zeatin Riboside (ZR) by dissolving 5 mg in 1-2 drops of 1 N NaOH, then dilute the solution with milli-Q water to a final volume of 5 mL. Sterilize the resulting solution using a 0.22 μ m cellulose acetate membrane syringe filter. Acetosyringone (AS) at 100 mM is prepared by dissolving the appropriate amount in 70% ethanol and sterilizing using a 0.22 μ m cellulose acetate membrane syringe filter.
3. Store all antibiotic and hormone stock solutions in 1 mL aliquots at -20°C.

2.2 Culture media preparation

1. LB Medium: dissolve 5 g NaCl, 10 g Bacto Tryptone, and 5 g Yeast Extract in 900 mL distilled water. If necessary, adjust pH to 7.5 using 5 N NaOH. Bring volume to 1000 mL with distilled water and autoclave for 15-20 minutes at 121°C and 1 atmosphere in a suitable container. For solid LB add 15 g/L of Agar before autoclaving.
2. Murashige & Skoog including Gamborg B5 vitamins (MS-Gamborg medium): For 1 L of culture medium, weight 4.44 g of commercial MS including Gamborg B5 vitamins, or dilute 8X Macronutrient, 200X Micronutrient, 100X Fe-EDTA, and 250X B5 vitamins stock solutions to a final concentration of 1X using milli-

Q water (*see Note 2*). Add 30 g/L sucrose and adjust pH to 5.8 with 5 N KOH after complete sucrose dissolution. For semi-solid medium, add 2.3 g/L Phytigel or 6-8 g/L Plant Tissue Culture Agar and adjust the volume with mili-Q water. For half-strength MS (1/2 MS medium), dissolve 2.22 g of commercial MS including Gamborg B5 vitamins or use a 0.5X final concentration of stock solutions, 15 g/L sucrose, and the same amount of gelling agent as regular MS (*see Note 3*). Sterilize by autoclaving for 15 minutes at 121°C and 1 atmosphere.

2.3 Tomato seed sterilization and germination

1. 200 tomato seeds of the desired genotype. In this work we used LT16 and LT46 elite breeding lines from the INIA Uruguay tomato breeding program.
2. 10 culture vessels containing half-strength MS-Agar.
3. Sterilization solution: prepare 50 mL of 1% sodium hypochlorite solution with 1-2 drops of detergent (dishwashing detergent or Tween 20). Prepare fresh.
4. Sterile absorbent paper: cut a stack of absorbent paper (8 cm-sided squares) and put them inside an aluminum foil envelope. Prepare several envelopes, autoclave them, and let them dry overnight or 24 hours in an incubator at 50-60°C.
5. Sterile distilled water.
6. Strainer, tweezers, alcohol burner (or another type of tweezers sterilizing device), magnetic stirrer, and stirring magnet. PVC film.

2.4 Tomato explant preparation

1. Two 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL liquid MS medium supplemented with 1 mg/L ZR each (MS-ZR).

2. Sterile Whatman filter paper: cut a stack of Whatman filter paper (10 cm sided squares) and put it inside a glass Petri dish (150 mm diameter), autoclave, and let it dry overnight or 24 hours at 50-60°C.
3. Sterile distilled water.
4. Sterile tweezers, scalpel, and alcohol burner (or another type of tweezers sterilizing device).
5. Orbital shaker.

2.5 *Agrobacterium* suspension preparation

1. Fresh plate of *A. tumefaciens* LBA4404 harboring the desired binary vector. We use *A. tumefaciens* LBA4404/pDIRECT22C in which *Agrobacterium* was transformed with pDIRECT22C which has KAN resistance for both bacteria and plant, as well as the cassettes for the expression of Cas9 and the sgRNAs that target the *CYC-B* gene [13].
2. LB medium for *A. tumefaciens* LBA4404/pDIRECT22C growth: LB supplemented with 25 µg/mL RIF, 50 µg/mL SP, and 50 µg/mL KAN (*see Note 4*). For liquid LB, incorporate the required volume of antibiotic stock solutions before bacterial inoculation. For LB-Agar plates, add antibiotics to the cooled (50°C) autoclaved media as described for liquid LB, and pour into sterile Petri dishes inside a laminar flow hood. If not used immediately, seal plates with PVC film and store plates at 4°C in the dark.
3. Liquid MS and 100 mM AS stock solution.
4. Sterile 250 mL Erlenmeyer flasks, 50 mL falcon tubes, and sterile Pasteur pipettes.
5. Incubator at 28°C with shaking, spectrophotometer with compatible cuvettes, centrifuge with 50 mL falcon tube compatible rotor.

2.6 Tomato explant transformation

1. Co-culture plates: Plastic Petri dishes containing MS-Agar supplemented with 1 mg/L ZR and 100 μ M AS (MS-ZR-AS). Add ZR and AS after the autoclaved media cools to 50°C. Mix well and pour the warm medium into sterile plastic Petri dishes.
2. Parafilm, sterile absorbent paper, tweezers, strainer, and alcohol burner (or another type of tweezers sterilizing device).
3. Incubator at 25°C with shaking.

2.7 Selection and regeneration of transformants

1. Selective media plates: prepare plastic Petri dishes containing MS-Phytigel supplemented with 1 mg/L ZR, 250 μ g/mL TIM, and 50 μ g/mL KAN (MS-ZTK). After autoclaving, cool the media to 50°C, incorporate the specified hormones and antibiotics, mix thoroughly, and pour into sterile plastic Petri dishes.
2. Rooting media vessels: dispense MS-Phytigel into culture vessels, cap with aluminum foil, and autoclave.
3. Sterile tweezers, scalpel, and alcohol burner (or alternative tweezers sterilizing device). PVC film.

2.8 *Ex vitro* acclimatization

1. Substrate mixture: 3 parts peat and 1 part perlite.
2. 1 L pots, transparent nylon bags, and rubber bands.
3. Water and container for washing the roots.

3. METHODS

All manipulations should be performed under aseptic conditions in a horizontal laminar flow hood, unless otherwise specified.

3.1 Seed sterilization and germination

1. Place 200 seeds of the desired tomato genotype in a 100 mL beaker containing 50 mL of Sterilization solution and a stirring magnet. Stir the seed/Sterilization solution mixture on a magnetic stirrer for 15 minutes (Figure 1a). This step does not require aseptic conditions.
2. Under aseptic conditions discard the sterilization solution using a strainer. Wash the seeds with 50 mL of sterile distilled water 2-3 times or until no foam is produced.
3. Remove excess of water from the seeds by placing 20 seeds at a time on sterile absorbent paper.
4. Immediately transfer the seeds to a culture vessel containing half-strength MS-Agar (Figure 1b). Cap the vessel with aluminum foil, seal it with PVC film, and place it in a dark container within the *in vitro* growth chamber for 8 days (at 25°C) (see **Note 5**). Repeat steps 3 and 4 for the remaining seeds.
5. Transfer the culture vessels to light conditions (8 hours dark-16 hours light at 25°C) for 1 day (Figure 1c). Plantlets should have fully expanded cotyledons and small developing leaves.

3.2 Explant preparation.

All steps must be performed under aseptic conditions using a horizontal laminar flow hood.

1. Add sterile distilled water to a Petri dish containing a stack of sterile Whatman papers, until they are soaked (*see Note 6*).
2. Transfer one or two elongated plantlets at a time to the moistened Whatman papers. Using a sterile scalpel and tweezers, remove the radicle, cotyledons, and apical meristem from each plantlet (Figure 1d).
3. Cut the hypocotyls (the section between the radicle and cotyledons, Figure 1d) into 0.5 cm segments. Transfer these segments to a 250 mL Erlenmeyer flask containing 100 mL of sterile liquid MS-ZR medium (Figure 1e). Repeat this process for all plantlets. Remove the top Whatman paper after processing 2 plantlets (to avoid contamination) and add more water to the Petri dish to maintain moisture.
4. Place the flasks on an orbital shaker in the growth chamber (8 hours dark-16 hours light at 25°C) for 18-20 hours.

3.3 *Agrobacterium* suspension preparation.

1. On the day of explant preparation, inoculate 10 mL of LB-RIF-SP-KAN medium with a sweep of *A. tumefaciens* LBA4404 containing the desired binary vector from a freshly streaked plate. We use pDIRECT22C which has KAN resistance for selection in bacteria and plants [13]. Prepare two culture tubes.
2. Incubate the pre-cultures overnight at 28°C with vigorous shaking (210-240 rpm), positioning the tubes at an angle for optimal oxygenation.
3. Monitor bacterial growth (*see Note 7*) and inoculate with 5 mL of the overnight culture into 2 separate 250 mL Erlenmeyer flasks containing 45 mL of liquid LB-

SP-KAN medium. Incubate at 28°C with vigorous shaking (210-240 rpm) in the dark.

4. Monitor the optical density (OD₆₀₀) every 45-50 minutes until the cultures reach an OD₆₀₀ between 0.4 and 0.5 (*see Note 8*).
5. Transfer the cultures to sterile 50 mL Falcon tubes and centrifuge them at 3500 x g for 15 minutes at ambient temperature (20-23°C).
6. Discard the supernatant and resuspend the bacterial pellet (using a Pasteur pipette) in the appropriate volume of liquid MS medium to achieve an OD₆₀₀ between 0.3 and 0.4. Add AS to a final concentration of 100 µM.
7. Incubate at 25°C with gentle agitation (50-70rpm) for 10-15 minutes under dark or low light conditions.

3.4 Transformation.

1. *Agrobacterium* Infection: remove liquid MS-ZR medium from the Erlenmeyer flasks (Figure 1e) by pouring the contents through a sterile strainer, retaining the hypocotyl explants within the flasks. Remove some hypocotyl explants (40-45) and transfer them to a new sterile Erlenmeyer containing liquid MS. These explants will be used as controls for selection and regeneration stages. Add the bacterial suspension so that it fully covers the explants to be transformed with *A. tumefaciens*. Incubate for 20 minutes at 25°C in dark or low-light conditions.
2. Explant Recovery: remove the explants from the flasks by pouring the contents through a sterile strainer, retaining the explants in the strainer.
3. Co-culture preparation: blot the explants dry on sterile absorbent paper. Do not let the explants dry for more than 10 seconds. Transfer them to co-culture plates, placing 30- 40 explants per plate (Figure 2a). Seal the plates with Parafilm and

place them in a dark container within the *in vitro* growth chamber (at 25°C).

Repeat this process for control explants omitting *Agrobacterium* infection.

4. Co-culture: incubate explants and bacteria for 24 hours.

3.5 Selection and regeneration of transformants.

1. Transfer to selective media: carefully transfer explants from the co-culture plates to the selective medium plates (MS-ZTK), placing 15-20 explants per plate. Seal the plates with Parafilm and incubate them in the growth chamber under white light conditions (500lux). Prepare control plates: transfer 20 control explants to a selective medium plate (selection control plate) and the remaining 20 explants to a plate containing selective medium without KAN (MS-ZT) (regeneration control plate).
2. Subculture: transfer explants to fresh Selective medium every 3 weeks (Figure 2b, 2c and 2d). Remove all necrotic tissue with a sharp scalpel. Explants from the selection control plate should be necrotic (Figure 2e) while explants from the regeneration control plate should be green and developing shoots (Figure 2f).
3. Rooting: once green shoots develop (Figure 2d, *see Note 9*), separate and transfer them to vessels containing Rooting medium (Figure 2g and 2h) (*see Note 10*). Once in Rooting medium, shoots will start to elongate, and roots typically appear within 2 to 3 weeks.

3.6 *Ex vitro* acclimatization.

1. Transfer to pot: When roots develop (Figure 3a), remove the plants from the culture vessel and gently wash their roots with water to remove the medium.

Transfer the plant to a 1 L pot filled with moist peat and perlite mixture (3:1 ratio). Cover the pot with a transparent plastic bag and secure it tightly with a rubber band (Figure 3b).

2. Humidity reduction: after 5-7 days, create a small opening at the top of the plastic bag and monitor the plant for signs of dehydration (*see Note 11*).
3. Gradual acclimatization: if no dehydration signs appear after one day, gradually enlarge the opening in the plastic bag and keep doing it for several days until the bag can be completely removed (*see Note 12*).

NOTES

1. Transformation efficiency was determined by dividing the number of regenerated plants positive to PCR screening (using primers to detect the kanamycin gene) by the total number of explants used in the transformation experiment and multiplying by 100.
2. Recipes for MS Gamborg with B5 Vitamins stock solutions.

8X Macronutrients stock solution: 3.52 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.36 g/L KH_2PO_4 , 13.20 g/L NH_4NO_3 , 15.20 g/L KNO_3 , 2.96 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

200X Micronutrients stock solution: 3.38 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.72 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.24 g/L H_3BO_3 , 0.0104 g/L $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.005 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.005 g/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

100X Fe-EDTA stock solution: 3.72 g/L Na_2EDTA , 2.78 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

250X B5 Vitamins (Gamborg) stock solution: dissolve each vitamin in 40 mL of water. Combine all solutions and dilute to a final volume of 200 mL with water. Myo-Inositol 5 g, Nicotinic acid 0.05 g (dissolve previously in 1 N NaOH and dilute to 40 mL with water), Pyridoxine HCl 0.05 g, Thiamine HCl 0.5 g.

3. Half-strength MS medium is used for germination since the seeds' endosperm has all the nutrients needed for germination and the plantlets will be only a few days in this medium.
4. *A. tumefaciens* LBA4404 exhibits chromosomal resistance to rifampicin, while streptomycin and spectinomycin resistance is conferred by the Ti plasmid (pAL4404)[14]. The pDIRECT22C binary vector carries bacterial and plant kanamycin resistance [12].
5. This step promotes hypocotyl elongation for obtaining more hypocotyl explants per plantlet.
6. This step helps prevent plantlet dehydration.
7. Make sure the culture is turbid without bacterial clumps.
8. Take 1 mL of the bacterial culture under aseptic conditions and measure OD at 600 nm. Discard the aliquot of the culture after measuring.
9. In resistant explants, one shoot per explant is usually obtained although more than one shoot per explant can also occur.
10. Rooting media does not contain any plant growth regulator or antibiotic. If no roots develop after 2 to 3 weeks, plants can be transferred to fresh media supplemented with activated charcoal (2.5 g/L). When adding activated charcoal, pH must be readjusted to 6.2. Also, increase agar to 9-10 g/L since activated charcoal reduces agar's gelling strength.
11. If dehydration signs appear within a few hours, close the hole made in the plastic bag with tape or paper clips to increase humidity. Reopen it for a few hours the following day and repeat this process until no dehydration signs appear.

12. The complete procedure from sowing the seeds to obtaining *ex vitro* plants takes from 6 to 9 weeks, depending on the genotype response to *in vitro* regeneration and growth.

REFERENCES

1. Wang Y, Sun C, Ye Z, et al (2024) The genomic route to tomato breeding: Past, present, and future. *Plant Physiol* 195:2500–2514. <https://doi.org/10.1093/PLPHYS/KIAE248>
2. Kimura S, Sinha N (2008) Tomato (*Solanum lycopersicum*): A Model Fruit-Bearing Crop. *Cold Spring Harb Protoc* 2008:pdb.emo105. <https://doi.org/10.1101/PDB.EMO105>
3. Brooks C, Nekrasov V, Lippman ZB, Van Eck J (2014) Efficient Gene Editing in Tomato in the First Generation Using the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-Associated9 System. *Plant Physiol* 166:1292–1297. <https://doi.org/10.1104/pp.114.247577>
4. Rajam M V, MADHULATHA P, PANDEY R, et al (2007) Applications of Genetic Engineering in Tomato. In: Razdan MK, Mattoo AK (eds) *Genetic improvement of solanaceous crops Volume 2: Tomato*. Science Publishers, Inc., Enfield; USA, pp 284–311
5. Prihatna C, Chen R, Barbetti MJ, Barker SJ (2019) Optimisation of regeneration parameters improves transformation efficiency of recalcitrant tomato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01583-w>
6. Park SH, Morris JL, Park JE, et al (2003) Efficient and genotype-independent *Agrobacterium*-mediated tomato transformation. *J Plant Physiol* 160:1253–1257. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-01103>
7. Pino LE, Lombardi-Crestana S, Azevedo MS, et al (2010) The Rg1 allele as a valuable tool for genetic transformation of the tomato “Micro-Tom” model system. *Plant Methods* 6:23. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-6-23>

8. Sun H-J, Uchii S, Watanabe S, Ezura H (2006) A Highly Efficient Transformation Protocol for Micro-Tom, a Model Cultivar for Tomato Functional Genomics. *Plant Cell Physiol* 47:426–431. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci251>
9. Van Eck J, Keen P, Tjahjadi M (2019) *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation of Tomato. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, New York, NY, pp 225–234
10. Frary A, Earle ED (1996) An examination of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato. *Plant Cell Rep* 16:235–240. <https://doi.org/10.1007/BF01890875/METRICS>
11. Pozueta-Romero J, Houlné G, Cañas L, et al (2001) Enhanced regeneration of tomato and pepper seedling explants for *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 67:173–180. <https://doi.org/10.1023/A:1011997926381/METRICS>
12. Arruabarrena A, Lado J, González-Arcos M, Vidal S (2023) Targeted disruption of tomato chromoplast-specific lycopene β -cyclase (CYC-B) gene promotes early accumulation of lycopene in fruits and enhanced postharvest cold tolerance. *Plant Biotechnol J* 21:2420–2422. <https://doi.org/10.1111/PBI.14169>
13. Čermák T, Curtin SJ, Gil-Humanes J, et al (2017) A Multipurpose Toolkit to Enable Advanced Genome Engineering in Plants. *Plant Cell* 29:1196–1217. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00922>
14. Hellens R, Mullineaux P, Klee H (2000) A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends Plant Sci* 5:446–451. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01740-4](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01740-4)

Figures:

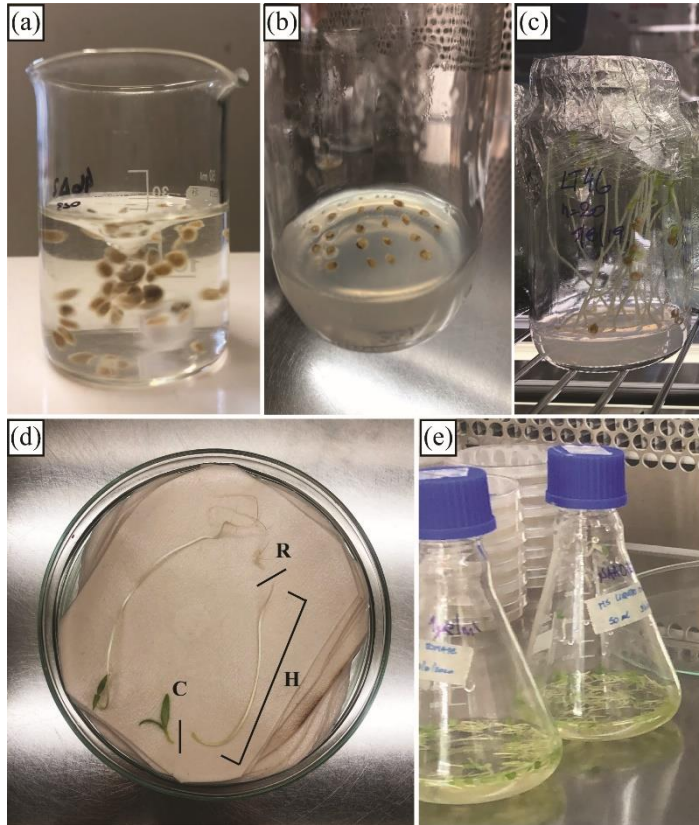


Figure 1. Seed sterilization, germination, and explant preparation. (a) seed sterilization procedure, (b) sown seeds in half-strength MS medium, (c) 10 days plantlets after 24 hours under white light conditions, (d) hypocotyl explants preparation. C: cotyledons; R: radicle; H: hypocotyl, (e) hypocotyl explants in liquid MS medium supplemented with 1 mg/L ZR.

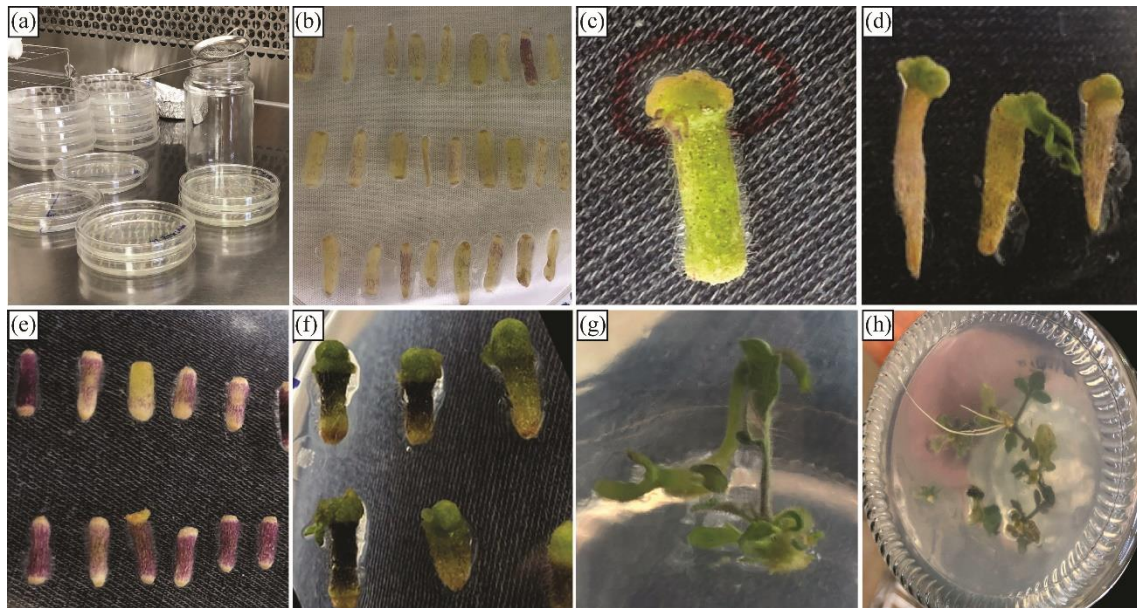


Figure 2. Explant transformation and regeneration process. (a) explants in co-culture plates, (b) explants in selective medium plates, (c) incipient shoot in selective medium, (d) developing shoot in selective medium, (e) untransformed control explants in selective medium (MS-ZTK) after 20 days (Selection Control Plate), (f) untransformed control explants in MS-ZT medium after 20 days (Regeneration Control Plate) (g) shoots in rooting media, (h) plantlets developing roots.



Figure 3. *Ex vitro* acclimatization. (a) fully regenerated plant in rooting medium before acclimatization, (b) plant in soil with plastic cover for gradual acclimatization.