

PONIENDO EN CLARO

Edición genética por CRISPR-Cas y sus aplicaciones en la mejora de los cultivos

Sergio Melero Royo^{1,1}, Nicole Martínez-García^{1,2} y María Luz Centeno Martín²

1. Graduados en Biotecnología (promoción 2015-2019). Facultad de C.C. Biológicas y Ambientales. Universidad de León. 1.1. smelero00@estudiantes.unileon.es; 1.2. nmartg05@unileon.es
2. Profesora Titular del Departamento de Ingeniería y Ciencias Agrarias, Área de Fisiología Vegetal, Universidad de León. mlcenm@unileon.es

Resumen

En los últimos años se ha desarrollado una tecnología de edición genética potente, barata y relativamente sencilla de usar. Se denomina CRISPR-Cas y se basa en utilizar los componentes de un sistema de inmunidad adaptativa de bacterias para modificar el genoma de un organismo. La metodología permite realizar cortes dirigidos y específicos en la doble cadena de DNA.

Gracias a la aplicación de CRISPR-Cas se han obtenido variedades de cultivo modificadas genéticamente con una eficiencia sin precedentes y que en la mayoría de los casos llegarán al mercado de una forma mucho más rápida que sus predecesores transgénicos. Entre las características incorporadas a estas nuevas variedades se encuentran varias resistencias a estreses bióticos y abióticos, mejoras en la calidad nutricional, o incluso la capacidad para producir moléculas de interés biomédico. La legislación de estos cultivos en diferentes partes del mundo es la principal barrera a la que se enfrenta esta tecnología.

Palabras clave: Mejora vegetal, modificación genética, OGM, transgénesis.

Edición genética por CRISPR-Cas

La tecnología CRISPR-Cas ha revolucionado el campo de la edición genética ya que permite realizar modificaciones en los genomas de los seres vivos de forma precisa y más eficiente que las metodologías anteriores. A pesar de su reciente desarrollo, pues sus primeras aplicaciones datan de 2013 (Wang *et al.*, 2013), ya existen ejemplos de su utilización para mejorar la productividad de los cultivos y de los animales de granja, así como para aumentar su resistencia a enfermedades, además de otras aplicaciones que se detallarán posteriormente. La clave de esta revolución reside en las 3 principales características de esta tecnología: es potente, barata y relativamente fácil de usar (Lin *et al.*, 2019).

En este artículo y el siguiente se revisan distintos aspectos metodológicos

Forma de mencionar este artículo: Melero, S., Martínez-García, N., Centeno, M.L. 2019, Edición genética por CRISPR-Cas y sus aplicaciones en la mejora de los cultivos. AmbioCiencias, 17, 14-31. ISBN: 1998-3021 (edición digital), 2147-8942 (edición impresa). Depósito legal: LE-903-07.

de CRISPR-Cas y algunas de sus utilidades, centrándose el primero en las aplicaciones en plantas y el segundo en animales. Los aspectos generales sobre la edición genética y sobre el sistema CRISPR-Cas9, comunes a ambos artículos, se explican a continuación.

¿Qué es la edición genética?

La edición genética es un conjunto de metodologías que permiten introducir cambios en el ADN mediante la generación de roturas de doble cadena (DSB) en las secuencias del genoma que se desea modificar (**Fig. 1**). En las células, estos DSB se pueden reparar por dos vías (Whitelaw *et al.*, 2016).

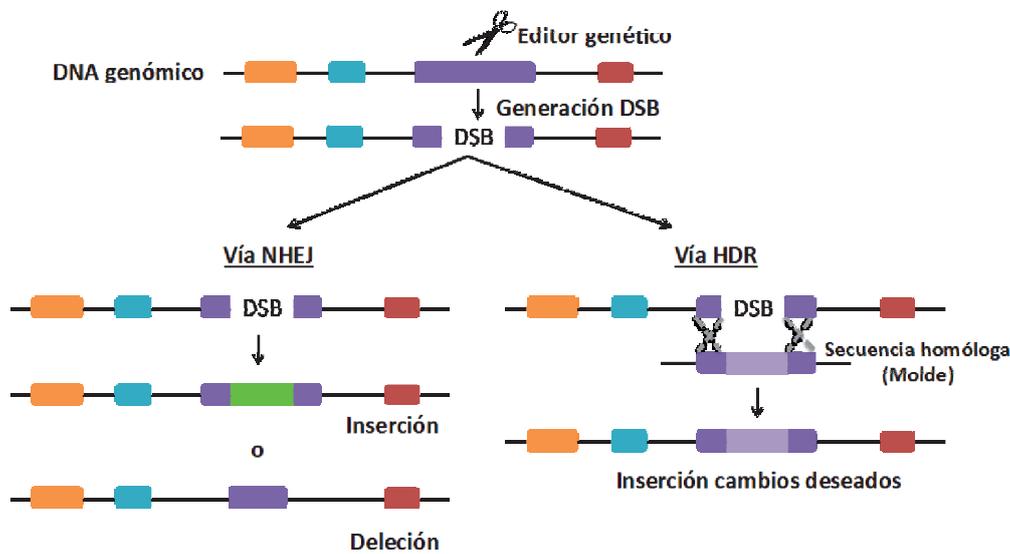


Figura 1. Vías de reparación celular de la rotura de doble cadena (DSB). NHEJ: unión de extremos no homólogos. HDR: reparación homóloga directa.

Hasta en el 90 % de los casos, los DSB son reparados a través del mecanismo de unión de extremos no homólogos (NHEJ). Esta vía es propensa a errores, lo que con frecuencia determina la introducción de inserciones o deleciones (*indels*) que afectan al marco de lectura del gen (**Fig. 1**). Por ello, se suele utilizar para inactivar secuencias génicas, generando individuos *knockout* (KO). Por otro lado, si junto con los editores genéticos se aporta una secuencia homóloga, esta puede ser utilizada como molde en la vía de reparación dirigida por homología (*homology directed repair*, HDR). En ese caso, se puede introducir el cambio deseado, incluso secuencias codificantes completas, en el locus diana generando un *knockin* (KI).

Los editores genéticos son complejos enzimáticos con actividad endonucleasa. En la edición genética se han utilizado, cronológicamente, las nucleasas

de dedos de zinc (ZFN), las nucleasas efectoras tipo activadores de transcripción (TALEN) y el sistema CRISPR-Cas9. Todos los editores tienen dos elementos comunes, uno responsable del reconocimiento de la secuencia diana en el genoma y otro con función endonucleasa para producir el DSB. En el caso de CRISPR-Cas9, el DSB es producido por la nucleasa Cas9, que es “guiada” hasta la secuencia diana previamente reconocida por una molécula de RNA. Esto último hace que su diseño y manejo sea más sencillo y económico que en el caso de las ZFN y las TALEN, donde el reconocimiento se realiza por dominios proteicos (Demirci *et al.*, 2018).

CRISPR-Cas en la naturaleza

En 1987, un grupo de investigadores de la universidad de Osaka observaron en bacterias unas secuencias repetitivas de 29 nucleótidos, situadas al lado del gen que trataban de clonar (Ishino *et al.*, 1987). Años después, el científico español Francisco Mojica logró identificar secuencias de virus insertadas entre estas repeticiones e intuyó que podían formar parte de un sistema de inmunidad bacteriana (Mojica *et al.*, 2005). Él mismo acuñó el acrónimo CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*). En 2007, Barrangou *et al.* publicaron el artículo que demostraba que las secuencias CRISPR eran parte de un sistema de inmunidad adaptativa de bacterias frente a fagos, mediado por el locus CRISPR y los genes cas (*CRISPR associated genes*) (**Fig. 2**), que codifican las proteínas con función endonucleasa.

El locus CRISPR contiene repeticiones (R) palindrómicas cortas de secuencias de DNA bacteriano, agrupadas y regularmente interespaciadas por secuencias variables llamadas espaciadores (E). Estos últimos son secuencias de plásmidos exógenos o de los genomas de virus que han infectado previamente a la célula y que han sido almacenados en el *array* CRISPR (Ahmad *et al.*, 2018). Por otro lado, los genes cas codifican proteínas conservadas (proteínas Cas).



Figura 2. Elementos del sistema CRISPR-Cas, indicándose las repeticiones (R) y los espaciadores (E).

Existen varios tipos de sistemas CRISPR-Cas que se diferencian en la proteína Cas. Los más conocidos son los tipos I, II y III, de los que forman parte Cas3, Cas9 y Cas10, respectivamente (Bhaya *et al.*, 2011). Todos actúan en la defensa frente a DNA exógeno mediante un mecanismo que se desarrolla en tres etapas: (1) detección del DNA foráneo y procesamiento para formar el espaciador, que se

incorpora en el *locus* CRISPR, (2) expresión del *locus* CRISPR ante una nueva amenaza de un virus ya conocido y, (3) reconocimiento por parte de los RNAs sintetizados de la secuencia de DNA diana, que muestra homología con los espaciadores, y actuación de las nucleasas Cas generando un DSB. De acuerdo con esto, podría pensarse que Cas cortaría tanto las secuencias exógenas como su propio locus CRISPR. Sin embargo, esto no sucede porque Cas reconoce un motivo adyacente, la secuencia PAM (*protospacer adjacent motif*) altamente conservada en los genomas virales y que no está presente en el locus CRISPR (Khatodia *et al.*, 2016). Las distintas proteínas Cas reconocen diferentes secuencias PAM.

CRISPR-Cas en el laboratorio

El sistema CRISPR-Cas más utilizado como herramienta en edición genética es de tipo II y procede de *Streptococcus pyogenes*. En este sistema participan la endonucleasa Cas9 y una pequeña molécula de RNA guía o sgRNA, que dirige a Cas9. El sgRNA se obtiene fusionando los dos RNAs presentes en el sistema natural: crRNA (CRISPR RNA) y tracrRNA (transactivador crRNA) (Fig. 3).

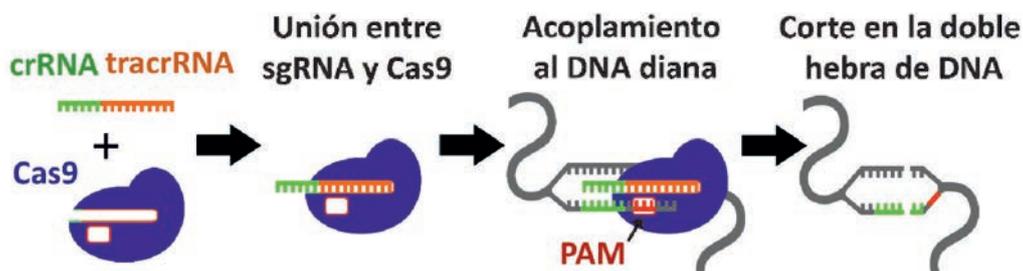


Figura 3. Representación esquemática de un proceso de corte en una secuencia diana mediado por CRISPR-Cas9. Adaptado de Addgene.

A la hora de aplicar el sistema CRISPR-Cas9, en primer lugar hay que definir la secuencia diana y cuál es la modificación que se quiere realizar, para lo que previamente se necesita tener secuenciado y caracterizado el genoma del organismo a modificar (Aglawe *et al.*, 2018). A continuación, y utilizando herramientas bioinformáticas, se buscan los posibles crRNA cercanos a la secuencia PAM reconocible por la Cas9 de *S. pyogenes* (5'-NGG). Además, estos programas analizan posibles repeticiones en otros puntos del genoma para evitar generar cortes indeseados (*off-target*). El crRNA seleccionado se sintetiza y se fusiona con el tracrRNA, dando lugar al sgRNA. Este sgRNA reconoce la secuencia de DNA diana y dirige a la nucleasa a esa región del genoma, donde generará un DSB a 3 pb en dirección 5' de la PAM) (Ishii, 2017) (Fig. 3).

La gran simplicidad de diseño del sgRNA, junto con la disponibilidad comercial de los elementos del sistema determina, entre otros factores, que sea una herramienta cuyo uso se ha difundido amplia y rápidamente.

CRISPR-Cas y la mejora genética vegetal

La principal aplicación de la edición genética por CRISPR-Cas9 en plantas es sin duda la mejora de los cultivos, una de las principales preocupaciones del hombre a lo largo de la historia. Llevamos modificando las plantas en beneficio propio desde hace unos 15000 años, cuando los primeros agricultores abandonaron la vida nómada y empezaron a seleccionar de forma intuitiva los individuos más productivos de una especie, los protegían, y repetían la selección entre sus descendientes. Tales hechos representaron una fuerte presión selectiva sobre el genoma de las especies (Wieczorek, 2012) y permitieron, entre otros muchos ejemplos, convertir lo que inicialmente era una mala hierba en lo que hoy conocemos como maíz (Fig. 4). Por lo tanto, se podría afirmar que la modificación genética de los cultivos es un proceso inherente a la agricultura, si bien se ha vuelto mucho más sofisticada con los años.

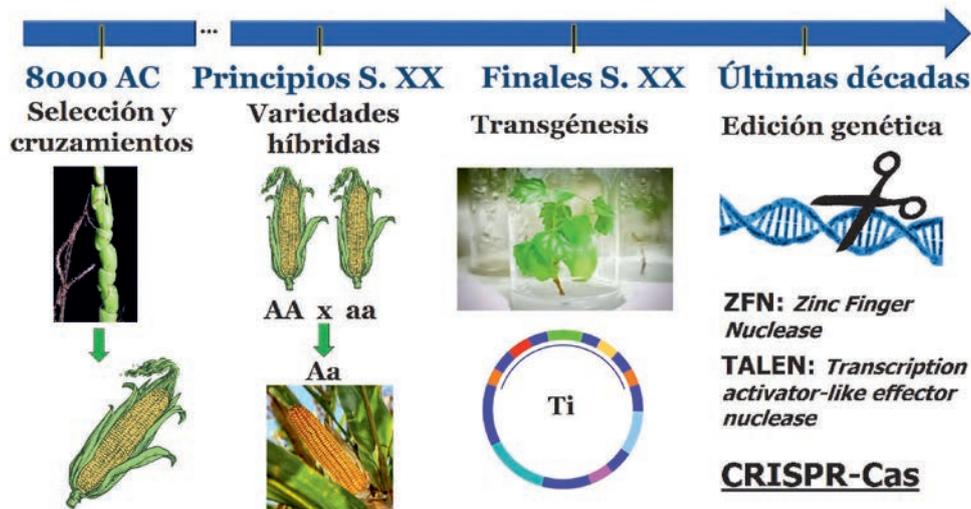


Figura 4. La historia de la mejora genética vegetal en 4 etapas.

El origen de lo que conocemos como mejora genética clásica data de principios del siglo XX, cuando la aplicación de las leyes de la herencia, descritas por Gregor Mendel en el XIX, permitió racionalizar los procesos de cruzamiento sexual entre plantas y selección de los descendientes, así como obtener las primeras líneas homocigóticas. El cruce de dos de estas líneas genera las llamadas variedades híbridas (Fig. 4), formadas por individuos con un genotipo casi idéntico que muestran los caracteres por los que se seleccionaron los parentales. Tales

variedades aportaron a la humanidad una mayor producción agrícola y de alimentos.

El siguiente avance en la mejora de los cultivos consistió en introducir genes provenientes de otras especies en su genoma, lo que se conoce como transgénesis (**Fig. 4**). Esto solo fue posible gracias al desarrollo de las técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales y de ingeniería genética. La última permitió diseñar los vectores de transformación basados en el plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*, bacteria patógena que ha evolucionado específicamente para introducir secuencias exógenas en el genoma de las plantas, y que resultaron ser muy útiles para realizar modificaciones genéticas en plantas (Vasil, 2008).

A. tumefaciens con frecuencia inserta la secuencia de DNA foráneo en zonas transcripcionalmente activas, pero lo hace de forma arbitraria, por lo que no permite editar un punto concreto del genoma. Esta fue la limitación resuelta por la edición genética, pues como ya se ha descrito, la nueva metodología ofrece la posibilidad de modificar puntos específicos de un genoma, inactivando genes por la vía de NHEJ o introduciendo genes nuevos en lugares concretos por la vía de HDR. Con esta vía se obtienen plantas transgénicas al igual que con *A. tumefaciens*, mientras que con la primera se logran variedades genéticamente editadas (GE) pero que no presentan genes exógenos en su genoma. Las variedades GE no transgénicas tienen la gran ventaja de que no deberán verse sometidas a los estrictos y tediosos controles que sí son obligatorios por normativa para los cultivos transgénicos en muchos países.

El empleo de la edición genética en el desarrollo de nuevas variedades, más productivas y resistentes, será clave para resolver el problema de cómo abastecer de alimentos a una población creciente y en un contexto de cambio climático, el cual conlleva un descenso de los recursos y el aumento de estreses bióticos y abióticos a los que se verán sometidos los cultivos (Jaganathan *et al.*, 2018).

Cómo editar plantas genéticamente usando CRISPR-Cas

En la **Fig. 5** se muestran los pasos de un proceso de modificación genética de plantas utilizando la metodología CRISPR-Cas. Tras diseñar y sintetizar los sgRNA adecuados siguiendo las pautas ya explicadas, el segundo paso consiste en elegir el mecanismo de envío del sgRNA y de Cas9 a las células vegetales, por lo general, cultivadas *in vitro*. Para este fin existen dos tipos de estrategias: las DNA-independientes y las DNA-dependientes.

Las estrategias DNA-independientes consisten en introducir en las células de plantas directamente el sgRNA, la nucleasa Cas9 y, en caso de que la edi-

ción se realice por la vía HDR, las sondas de DNA. En principio parece un método sencillo y limpio, dado que al no utilizar vectores de expresión no hay posibilidad de regenerar plantas transgénicas, salvo que ese sea el objetivo (edición HDR). Además, los elementos de CRISPR-Cas9 serán degradados con el tiempo una vez realizada su función y, finalmente, se obtendrá una modificación genética precisa con el menor número de efectos indeseados. El principal problema reside en la pared de las células vegetales, que representa una barrera mecánica que dificulta el envío directo de los complejos sgRNA-Cas9 a su interior. El empleo de protoplastos o células sin pared celular puede ser una solución. Sin embargo, la regeneración de plantas completas a partir de protoplastos es muy compleja, en especial para especies monocotiledóneas entre las que se incluyen cultivos de gran interés como el maíz, el trigo y la cebada (Liang *et al.*, 2017). Para estos cultivos existe otra estrategia que consiste en bombardear embriones inmaduros con partículas de oro recubiertas de complejos sgRNA-Cas9 – (Svitashev *et al.*, 2016), seguido de la regeneración de embriones somáticos portadores de la edición.

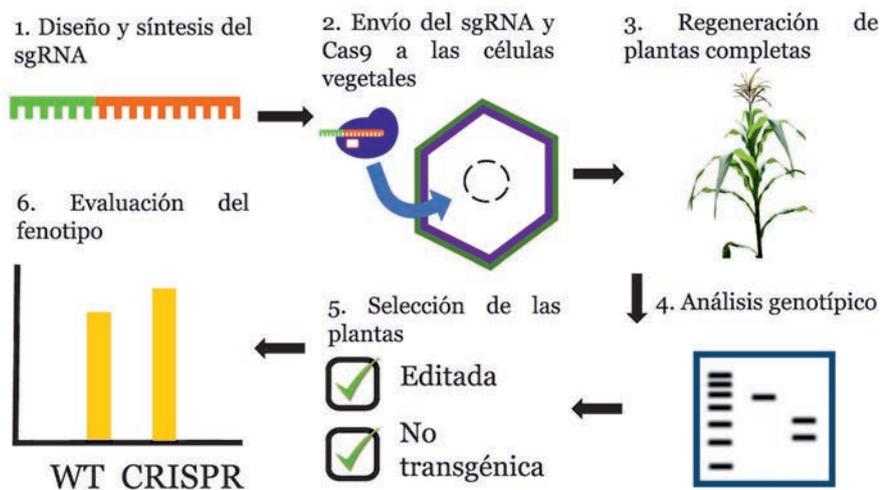


Figura 5. Representación esquemática de un proceso de mejora vegetal usando la edición genética por CRISPR-Cas9.

Aunque los métodos de edición DNA-independientes se han aplicado con éxito en arabisidopsis, tabaco, lechuga, arroz, petunia, trigo, soja, maíz, manzana y uva (Malnoy *et al.*, 2016; Liang *et al.*, 2019), todavía presentan limitaciones para la mayoría de las especies (Veillet *et al.*, 2019). En esos casos se recurre a métodos DNA-dependientes, caracterizados por utilizar vectores de expresión artificiales portadores de secuencias de DNA codificantes de la nucleasa Cas9 y del sgRNA. Una vez que las secuencias se introducen en las células, la idea es que se expresen

para dar lugar a los elementos del sistema de edición que, finalmente, llevan a cabo la modificación en el genoma de la célula. La principal desventaja es la posibilidad de que el DNA foráneo que codifica para los elementos de CRISPR-Cas9 se inserte en el genoma de las células de manera estable, dando lugar a plantas GE y, además, transgénicas, las cuales no interesan en muchos casos por temas de regulación.

Como vehículo de transferencia del DNA exógeno se emplea sobretodo la bacteria *A. tumefaciens* que, se ha utilizado durante mucho tiempo para obtener plantas transgénicas. Generalmente se usan cepas recombinantes portadoras de dos plásmidos (vectores binarios). El primero contiene el DNA de transferencia (T-DNA) con las secuencias que se van a transferir a la célula vegetal, en este caso las que codifican para Cas9 y el sgRNA (**Fig. 6**). El segundo es un plásmido *helper* que lleva los genes *Vir*, necesarios para que la bacteria realice el procesamiento y el transporte del T-DNA a las células vegetales (Díaz y Chaparro, 2012).

En la práctica ya hay disponibles vectores artificiales en cuyo T-DNA se encuentra la secuencia de Cas9 optimizada con el código genético de la célula diana, un promotor para su expresión y la secuencia de localización nuclear, necesaria para que el complejo Cas9-sgRNA acceda al núcleo de la célula (Sun *et al.*, 2017). Además los vectores cuentan con sitios de restricción únicos en su T-DNA para que el usuario inserte la secuencia del sgRNA diseñado, la cual también contará con un promotor adecuado, por lo general el de la polimerasa III (Aglawe *et al.*, 2018). Tras elaborar y clonar el vector, este se introduce en una cepa de *Agrobacterium* que contiene el plásmido *helper* (**Fig. 6**). Finalmente, se ponen en contacto la cepa transformada de *Agrobacterium* y las células vegetales en cultivo para que suceda la transferencia del T-DNA (Díaz y Chaparro, 2012).

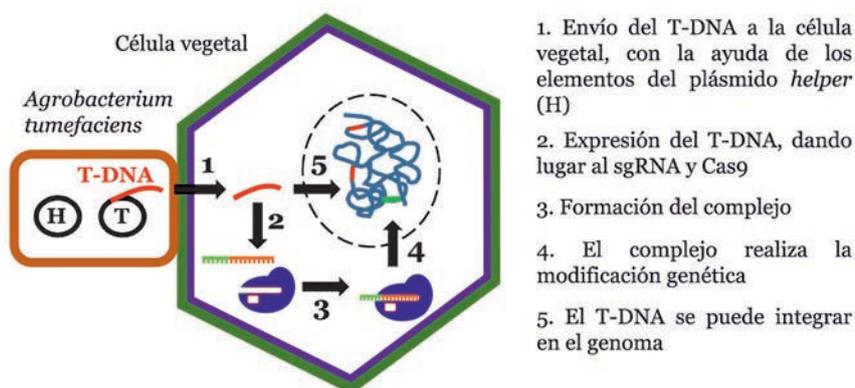


Figura 6. Proceso de edición genética por CRISPR-Cas utilizando el método de transferencia de DNA por *Agrobacterium tumefaciens*.

Una vez que el sistema CRISPR-Cas9 ha realizado la modificación deseada en las células vegetales, el siguiente paso es regenerar plantas GE completas a partir de esas células (paso 3 de la **Fig. 5**). Para ello existen dos estrategias que proporcionan las técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos. La primera es la organogénesis, que consiste en inducir la formación de tallos adventicios y después de raíces en la base de esos tallos. La segunda es la embriogénesis somática, por la cual se desarrollan embriones a partir de las células somáticas modificadas que, posteriormente, germinan dando lugar a las plantas.

Los pasos cuarto y quinto de un proyecto de modificación por edición genética (**Fig. 5**) son el análisis genotípico de las plantas regeneradas, para comprobar que contienen la mutación de interés, y su selección. Lo más eficaz y preciso para hacer esto es secuenciar el genoma de las plantas, pero también es lo más costoso. Una alternativa consiste en: 1) amplificar la región diana de la mutación por PCR, 2) digerir el amplicón con una enzima de restricción con especificidad por la secuencia original pero que no corte en la modificada y, 3) realizar una electroforesis del DNA digerido (Sun *et al.*, 2017). De este modo es posible distinguir las plantas sin modificar (aparecerán dos bandas en la electroforesis) de las modificadas (se observa una banda resistente al corte). La confirmación de estas últimas como GE se podrá hacer por secuenciación.

Puesto que los métodos más utilizados para editar plantas por CRISPR-Cas9 se basan en estrategias DNA-dependientes que pueden dar lugar a transgénesis, en aquellos casos en los que este no es el objetivo de la edición, los cuales representan la mayoría, hay que asegurarse de que las plantas GE no sean portadoras de transgenes. Para ello, primero se autopolinizan las plantas regeneradas transgénicas y GE (G_0 en la **Fig. 7**). Su selección es sencilla si en el T-DNA del vector de expresión utilizado en la edición se ha integrado, junto a las secuencias de la nucleasa y del sgRNA, un gen de selección. Este se insertará también en el genoma de las células vegetales, lo que permitirá obtener plantas en un medio de selección (Sun *et al.*, 2017) asegurando que sean transgénicas y aumentando las probabilidades de que tengan la modificación deseada. Una vez generados los descendientes de las plantas G_0 autopolinizadas, y debido a la segregación independiente de los *loci* del transgen y de la edición (**Fig. 7**), se podrán seleccionar entre ellos los que lleven en su genoma la mutación pero no copias del transgén (Khatodia *et al.*, 2016).

Por último, hay que evaluar el fenotipo en las plantas seleccionadas (paso 6 de la **Fig. 5**) con un doble objetivo: a) analizar las características que presentan las plantas GE frente a las no modificadas (ganancia) y b) cuantificar el nivel de mejora, por ejemplo, en el rendimiento de la cosecha o en la concentración de algún componente que haga a la variedad más saludable.

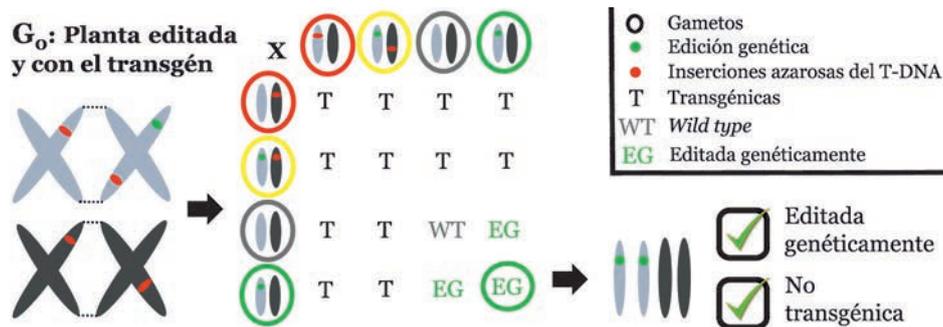


Figura 7. Representación gráfica de la eliminación por segregación de las copias del T-DNA (rojo) y selección positiva de la edición genética (verde). Adaptado de Khatodia *et al.*, (2016).

Aplicaciones de la edición genética por CRISPR-Cas9 en plantas

Generación de cultivos resistentes a estreses abióticos

El desarrollo de las plantas está mucho más fuertemente condicionado por factores ambientales que el de los animales, dado que al ser organismos vegetativos solo tienen la opción de adaptarse a las condiciones ambientales cambiantes. En la naturaleza, las plantas rara vez crecen en condiciones óptimas y es por esto que, para la mayoría de las especies, el resultado evolutivo de las plantas silvestres no coincide con el genoma ideal que se busca en un cultivar. A día de hoy se han realizado algunos estudios aplicando la edición genética por CRISPR-Cas para obtener cultivos resistentes a estreses abióticos, demostrado así la efectividad del sistema.

Un ejemplo relevante de esta aplicación son las plantas de maíz GE que presentan una productividad mayor que la variedad original en condiciones de sequía, y similar a la mostrada por ellas mismas bajo condiciones normales (Shi *et al.*, 2017). El resultado de la edición genética realizada por los investigadores afecta a la ruta de señalización del etileno, una hormona gaseosa que habitualmente reduce la división y el crecimiento celular en plantas sometidas a estrés abiótico. En estudios previos se había demostrado que plantas transgénicas de maíz, que sintetizaban menos etileno en condiciones de sequía, presentaban menores pérdidas de cosecha que las plantas control (Habben *et al.*, 2015). Teniendo en cuenta esos resultados, la estrategia planteada por Shi *et al.*, (2017) consistió en sobre-expresar el gen del regulador negativo del etileno *ARGO8*. Esta proteína interfiere con la respuesta a etileno porque interacciona con el receptor de la hormona, inhibiendo así su percepción celular. De esta forma, *ARGO8* permite indirectamente el crecimiento de las plantas en condiciones de sequía. Para lograr la sobre-expresión de *ARGO8*, los autores sustituyeron el promotor nativo del gen por otro más potente e inespecífico de tejido, el del gen *GOS2* del

maíz. Con este fin, aportaron junto con Cas9, dos sgRNAs dirigidos para cortar a ambos lados del promotor nativo y una sonda de DNA correspondiente a la secuencia del promotor *GOS2*, flanqueada por las regiones correspondientes a los lados del promotor nativo. Es decir, intercambiaron un promotor por otro más potente gracias a la vía de HDR. Las plantas GE, además de ser resistentes a sequía, no son transgénicas puesto que la secuencia incluida no es exógena sino que proviene del maíz.

Generación de cultivos resistentes a estreses bióticos

Las diferentes fuentes de estrés biótico para los cultivos incluyen fitopatógenos (virus, hongos y bacterias causantes de enfermedades), insectos fitófagos e incluso plantas competidoras. Las aplicaciones del sistema CRISPR-Cas para generar líneas resistentes a estreses bióticos son abundantes, especialmente en el caso de los fitopatógenos. De entre ellos, las infecciones virales causan del 10 al 15% de las pérdidas de la producción agrícola total. Una de las principales dianas a la hora de generar plantas GE resistentes a virus es el gen *elf4E* que codifica un factor de transcripción con un papel fundamental para la multiplicación de muchos virus dentro de las células vegetales. Así, existen gran cantidad de trabajos que describen la obtención de plantas *KO* para este gen y que como consecuencia son resistentes a diferentes cepas de virus.

En relación a cultivos GE resistentes a otro tipo de patógenos, un ejemplo son las plantas *KO* para los genes *MLO* (mildew-resistance locus) y resistentes al oídio. La enfermedad está causada por hongos del orden de los Erisiphales, afecta a un espectro muy amplio de cultivos y es fácilmente identificable por la presencia de una capa blanquecina en las hojas de las plantas infectadas. Los genes *MLO* codifican proteínas que hacen susceptibles a las plantas de ser infectadas por el hongo. Por lo tanto, han representado la diana en muchos estudios de edición genética. En uno de ellos (Wang *et al.*, 2014), se obtuvieron plantas de trigo homocigóticas *KO* para 3 alelos del gen *MLO* que contaban con un fenotipo resistente (**Fig. 8**).

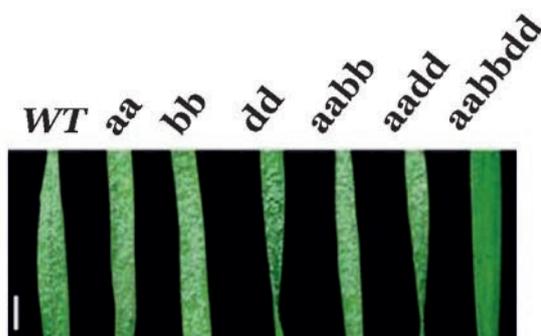


Figura 8. Fenotipos de las plantas infectadas sin modificar (*WT*), *KO* para alguno de los alelos y *KO* para los tres alelos del gen *MLO* (Wang *et al.*, 2014).

Generación de plantas con calidad nutricional superior

La aplicación de la biotecnología vegetal para obtener plantas de mayor calidad nutricional resulta extremadamente interesante. Por ejemplo, uno de los mayores hitos fue la generación del arroz dorado, una variedad transgénica que sintetiza grandes cantidades de β -caroteno o provitamina A, al contrario que el arroz blanco que es deficiente en este nutriente esencial. El consumo de arroz dorado por parte de grandes poblaciones humanas, localizadas sobretudo en regiones pobres, podría prevenir enfermedades causadas por un aporte insuficiente de β -caroteno.

También se han obtenido variedades de arroz más saludables gracias a la edición genética por CRISPR-Cas, modificando la ruta de síntesis del almidón. Este polisacárido es el principal componente del arroz y se presenta en dos formas moleculares, amilosa y amilopectina. Los almidones son tanto más saludables cuanto mayor sea su proporción de amilosa, debido a que esta constituye una mayor fuente de almidón resistente, el cual ayuda a prevenir infecciones serias y a reducir el índice glucémico. Sin embargo, el porcentaje de amilosa en el almidón del arroz suele ser como máximo del 30%. El equipo de Sun *et al.* (2017) trató de desviar la ruta de síntesis del almidón hacia la amilosa. Para ello realizaron un *KO* del gen *SBEIIb* que juega un papel importante en la síntesis de la amilopectina. Como resultado obtuvieron plantas GE con una proporción de amilosa un 10% superior (**Fig. 9**).

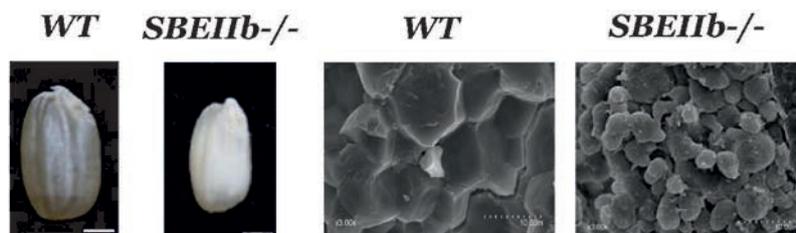


Figura 9. Fenotipo de los granos de arroz y del almidón en estos, provenientes de plantas sin modificar (*WT*) y *KO* para el gen *SBEIIb*. Adaptado de Sun *et al.* (2017).

Otras aplicaciones

Además de las aplicaciones de la edición por CRIPR-Cas9 para mejorar los cultivos que ya se han descrito en este apartado, existen otras muy diversas. Una de ellas es la obtención de plantas biofactoría, es decir, plantas capaces de “fabricar” proteínas recombinantes de interés comercial (*molecular farming*), entre las que se encuentran los anticuerpos. Sin embargo, su producción en planta tiene un problema y es que, al tratarse de glicoproteínas, se incorporan residuos azúcar que son característicos de plantas y no de animales, como la

$\beta(1,2)$ -xilosa o la $\alpha(1,3)$ -fucosa. Tales residuos pueden interferir con la actividad del anticuerpo recombinante o causar reacciones inmunológicas indeseadas. Por esta razón, Mercx *et al.* (2017) se propusieron generar plantas de tabaco *KO* para los genes *XylT* y *FucT*, que codifican las enzimas responsables de las glicosilaciones mencionadas. Las plantas GE resultantes, *KO* para 12 alelos en total, se transformaron con los genes de un anticuerpo que lograron sintetizar sin que contuviera xilosa ni fucosa.

Por último, la edición por CRIPR-Cas9 también permite acelerar los procesos de domesticación de plantas. Así lo demostró el equipo de Zsögön *et al.* (2018), que logró domesticar una variedad silvestre de tomate en un solo ensayo mediante el *KO* de 6 genes (**Fig. 10**). Las plantas GE produjeron 10 veces más tomates que las no modificadas y los frutos tuvieron un tamaño superior y una calidad nutricional mejorada, pues acumularon 5 veces más licopeno. Este tipo de aplicaciones pueden ayudar a preservar la diversidad genética natural (biodiversidad) de las especies, que representa la base de todo proceso de mejora y cuya pérdida con el paso del tiempo es uno de los problemas de la agricultura moderna.

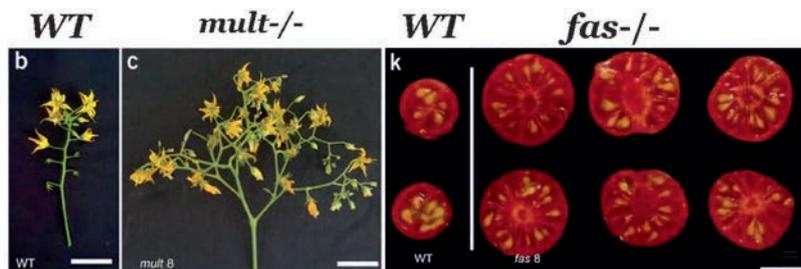


Figura 10. Fenotipo de las inflorescencias y frutos en tomates silvestres (*WT*) y *KO* para *mult* y *fas*. Adaptado de Zsögön *et al.* (2018).

Regulación de los cultivos editados genéticamente

Como ya se mencionó, la tecnología CRISPR-Cas9 se puede aplicar para generar plantas en las que se incorpora de forma estable una secuencia de DNA exógena, al igual que sucede en los cultivos transgénicos obtenidos mediante transformación. Pero la edición genética también puede dar lugar a plantas no transgénicas, con modificaciones similares a las mutaciones espontáneas o a las producidas por agentes mutagénicos y que, por lo tanto, no pueden ser distinguidas de las plantas obtenidas por métodos de mejora tradicionales. Basándose en esta información, sería lógico que las variedades GE no transgénicas fueran sometidas a una regulación distinta y menos restrictiva que los cultivos transgénicos. Esta es la visión adoptada por la mayor parte de los países a

excepción de los ubicados en la Unión Europea (UE).

La decisión que acontece a la regulación de los nuevos cultivos GE no transgénicos en Europa fue tomada por el Tribunal de Justicia de la UE en 2018. Se concluyó que los estados miembros los regularían de la misma forma que los cultivos biotecnológicos ya existentes. En otras palabras, prácticamente se prohibió su cultivo y comercialización, dado que la mayor parte de los países miembros tiene prohibido el cultivo de transgénicos (Holman, 2019). La decisión es una mala noticia por numerosas razones. Por ejemplo, afectará de manera negativa al continente africano, de donde Europa importa la mayor parte de los productos agrícolas, y donde se están desarrollando variedades GE por CRISPR-Cas (Gomez *et al.*, 2019).

Sin embargo, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) establece que no se tratarán como organismos transgénicos aquellos que hubieran podido obtenerse igualmente por métodos de mejora tradicionales (**Tabla 1**). Esto incluye: deleciones, sustituciones de unos pocos pares de bases, inserciones de secuencias provenientes de plantas compatibles para la reproducción, o descendencia que no contenga el transgén gracias a la segregación (Ramaiah, 2018). Por otro lado, el sistema de regulación canadiense se basa en evaluar el producto final y no la tecnología a través de la cual se ha generado el cultivo, esto favorece a las plantas GE. Japón, que siempre ha sido un país reactivo a los cultivos biotecnológicos, no ha seguido el camino de Europa y ha estipulado que los cultivos GE que no contengan secuencias exógenas no deberían ser sometidos al protocolo de Cartagena, es decir, no deberían ser tratados como transgénicos. Otros países de acuerdo con no evaluar a los cultivos GE de la misma forma que a los transgénicos incluyen: Australia, Brasil, Guatemala, Colombia, República Dominicana, Honduras, Jordania, Paraguay, Uruguay, Chile, Argentina, Vietnam y la Comunidad Económica de Estados de África Occidental (Ramaiah, 2018; Holman, 2019).

La tecnología CRISPR-Cas ya ha demostrado su potencial con una velocidad sin precedentes (**Tabla 1**). Por desgracia, la política regulatoria supone el principal obstáculo en algunos países. La divulgación científica que explique, de forma transparente y objetiva, en qué consiste la técnica y cuáles son sus aplicaciones y beneficios, será una herramienta esencial para ganarse la confianza del público.

Tabla 1. Listado de cultivos modificados genéticamente por CRISPR-Cas que el USDA no regulará bajo el artículo 7CFR parte 340. I.P: Información protegida(USDA, 2019).

Fecha	Institución	Variedad de cultivo modificado
31/7/2019	Altria Client Services LLC	Línea de tabaco (I.P).
17/6/2019	University of Minnesota	Soja con cambios en la longitud del peciolo.
17/06/2019	University of Minnesota	Soja con composición de la semilla alterada.
19/4/2019	Illinois State University	<i>Thlaspi arvense</i> (I.P).
27/9/2018	Yield10 Bioscience	Línea de camelina (I.P).
6/8/2018	Illinois State University	<i>Thlaspi arvense</i> (I.P).
12/7/2018	Iowa State University	Maíz (I.P).
14/5/2018	University of Florida	Tomate <i>KO</i> para el gen <i>JOINTLESS2</i> .
16/1/2018	DuPont Pioneer	Maíz resistente a la enfermedad causada por el hongo <i>Setosphaeria turcica</i> . Reemplazo del alelo del gen <i>NLB18</i> .
16/10/2017	USDA ARS	Soja resistente a sequía y salinidad. <i>KO</i> para los genes <i>Drb2a</i> y <i>Drb2b</i> .
29/8/2017	Yield10 Bioscience	Camelina con mayor contenido en aceite.
7/4/2017	Donald Danforth Plant Science Center	<i>Setaria viridis</i> con florecimiento retardado. <i>KO</i> del gen homólogo a <i>ID1</i> en <i>Zea mays</i> .
18/4/2016	DuPont Pioneer	Maíz Waxy con contenido prácticamente exclusivo de amilopectina en el almidón. <i>KO</i> para el gen <i>Wx1</i> .
13/4/2016	Pennsylvania State University	Champiñón común <i>KO</i> para el gen de la polifenol oxidasa.

Bibliografía

- Aglawe, S. B., Barbadikar, K. M., Mangrauthia, S. K. y Madhav y M. S. 2018. New breeding technique «genome editing» for crop improvement: applications, potentials and challenges *3 Biotech* 8(8):336-356
- Ahmad, H. I., Ahmad, M. J., Asif, A. R., Adnan, M., Iqbal, M. K., Mehmood, K., Muhammad, S. A., Bhuiyan, A. A., Elokil, A., Du, X., Zhao, C., Liu, X. y Xie, S. 2018. A review of crispr-based genome editing: Survival, evolution and challenges. *Current Issues in Molecular Biology*:47-68
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A. y Horvath, P. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes, *Science* 315(5819):1709-1712
- Bhaya, D., Davison, M. y Barrangou, R. 2011. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annual review of genetics* 45:273-97
- Demirci, Y., Zhang, B. y Unver, T. 2018. CRISPR/Cas9: An RNA-guided highly precise synthetic tool for plant genome editing. *Journal of cellular physiology* 233(3):1844-1859
- Díaz, C. y Chaparro, A. 2012. Métodos de transformación genética en plantas, *U.D.C.A Actualidad & divulgación científica* 15(1):49-61
- Gomez, M. A., Lin, Z. D., Moll, T., Chauhan, R. D., Hayden, L., Renninger, K., Beyene, G., Taylor, N. J., Carrington, J. C., Staskawicz, B. J. y Bart, R. S. 2019. Simultaneous CRISPR/Cas9-mediated editing of cassava eIF4E isoforms nCBP-1 and nCBP-2 reduces cassava brown streak disease symptom severity and incidence, *Plant biotechnology journal* 17(2):421-434
- Habben, J. E., Bao, X., Bate, N. J., DeBruin, J. L., Dolan, D., Hasegawa, D., Helentjaris, T. G., Lafitte, R. H., Lovan, N., Mo, H., Reimann, K. y Schussler, J. R. 2015. Transgenic alteration of ethylene biosynthesis increases grain yield in maize under field drought-stress conditions, *Plant biotechnology journal* 12(6):685-693
- Holman, C. M. 2019. A fractured international response to CRISPR-enabled gene editing of agricultural products, *Biotechnology law report* 38(1):3-23
- Ishii, T. 2017. Genome-edited livestock: Ethics and social acceptance, *Animal Frontiers* 7(2):24-32.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. y Nakata, A. 1987. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product, *Journal of bacteriology* 169(12):5429-33
- Jaganathan, D., Ramasamy, K., Sellamuthu, G., Jayabalan, S. y Venkataraman, G. 2018. CRISPR for crop improvement: an update review, *Frontiers in plant science*, 9(985):1-17.
- Khatodia, S., Bhatotia, K., Passricha, N., Khurana, S. M. P. y Tuteja, N. (2016) The CRISPR/Cas genome-editing tool: application in improvement of crops, *Frontiers in plant science*, 7(506):1-13.
- Liang, Z., Chen, K. y Gao, C. 2019. Biolistic delivery of CRISPR/Cas9 with ribonucleoprotein complex in wheat, *Methods in molecular biology*

- 1927(24):327-335
- Liang, Z., Chen, K., Li, T., Zhang, Y., Wang, Y., Zhao, Q., Liu, J., Zhang, H., Liu, C., Ran, Y. y Gao, C. 2017. Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes, *Nature communications* 8(14261):1-5
- Lin, H., Deng, Q., Li, L. y Shi, L. 2019. Application and Development of CRISPR/Cas9 Technology in Pig Research, en *Gene Editing - Technologies and Applications*.
- Malnoy, M., Viola, R., Jung, M.-H., Koo, O.-J., Kim, S., Kim, J.-S., Velasco, R. y Nagamangala Kanchiswamy, C. 2016. DNA-free genetically edited grapevine and apple protoplast using CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins, *Frontiers in plant science* 7(1904):1-9
- Mercx, S., Smargiasso, N., Chaumont, F., De Pauw, E., Boutry, M. y Navarre, C. 2017. Inactivation of the $\beta(1,2)$ -xylosyltransferase and the $\alpha(1,3)$ -fucosyltransferase genes in *Nicotiana tabacum* BY-2 Cells by a Multiplex CRISPR/Cas9 Strategy Results in Glycoproteins without Plant-Specific Glycans, *Frontiers in plant science* 8(403):1-11
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J. y Soria, E. 2005. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements, *Journal of molecular evolution* 60(2):174-182
- Shi, J., Gao, H., Wang, H., Lafitte, H. R., Archibald, R. L., Yang, M., Hakimi, S. M., Mo, H. y Habben, J. E. 2017. ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions, *Plant biotechnology journal* 15(2):207-216
- Sun, Y., Jiao, G., Liu, Z., Zhang, X., Li, J., Guo, X., Du, W., Du, J., Francis, F., Zhao, Y. y Xia, L. 2017. Generation of High-Amylose Rice through CRISPR/Cas9-Mediated Targeted Mutagenesis of Starch Branching Enzymes, *Frontiers in Plant Science* 8:298
- Svitashev, S., Schwartz, C., Lenderts, B., Young, J. K. y Mark Cigan, A. 2016. Genome editing in maize directed by CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes, *Nature communications* 7(13274):1-7
- Vasil, I. K. 2008. A history of plant biotechnology: from the Cell Theory of Schleiden and Schwann to biotech crops, *Plant cell reports* 27(9):1423-1440
- Veillet, F., Perrot, L., Chauvin, L., Kermarrec, M.-P., Guyon-Debast, A., Chauvin, J.-E., Nogué, F. y Mazier, M. 2019. Transgene-free genome editing in tomato and potato plants using *Agrobacterium*-mediated delivery of a CRISPR/Cas9 cytidine base editor, *International journal of molecular sciences* 20(2):402
- Wang, H., Yang, H., Shivalila, C. S., Dawlaty, M. M., Cheng, A. W., Zhang, F. y Jaenisch, R. 2013. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering, *Cell* 153(4):910-918
- Wang, Y., Cheng, X., Shan, Q., Zhang, Y., Liu, J., Gao, C. y Qiu, J.-L. 2014. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew, *Nature biotechnology* 32(9), pp. 947-951
- Whitelaw, C. B. A., Sheets, T. P., Lillico, S. G. y Telugu, B. P. 2016. Engineering large animal models of human disease, *The Journal of Pathology* 238(2):247-56
- Wieczorek, W. 2012. History of agricultural biotechnology: how crop development has evolved, *Nature Education Knowledge* 3(10):1-9

- Zsögön, A., Čermák, T., Naves, E. R., Notini, M. M., Edel, K. H., Weigl, S., Freschi, L., Voytas, D. F., Kudla, J. y Peres, L. E. P. 2018. *De novo* domestication of wild tomato using genome editing, *Nature Biotechnology*, 36(12):1211-1216
- Addgene. 2019. <https://www.addgene.org/crispr/guide> (Acceso 2/19/2019)
- Ramaiah, V. 2018. <http://ilsirf.org/wp-content/uploads/sites/5/2018/09/4.-SABC2018-Valas-Presentation-17Sept2018-F.pdf> (Acceso 23/03/2019)
- USDA. 2019. https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/biotechnology/am-i-regulated/regulated_article_letters_of_inquiry/regulated_article_letters_of_inquiry (Acceso 7/11/2019).