

MEJORA VEGETAL



Regeneración vegetal *in vitro*.

La edición mediante CRISPR y su potencial en agricultura

El sistema CRISPR es una herramienta con la que podemos editar genomas de forma dirigida y sin dejar rastro. Constituye un claro ejemplo de cómo la investigación básica puede propiciar el descubrimiento de una herramienta que, como en este caso, suponga una auténtica revolución, tanto en agricultura como en medicina.

CRISPR es el acrónimo en inglés de Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Espaciadas). En la **Figura 1**, se puede observar una cronología de su descubrimiento. Hace ya varias décadas, el doctor Francis Mojica (Universidad de Alicante) observó la presencia de estas repeticiones de función desconocida en el genoma de arqueas del género *Haloferax*. Posteriormente, se comprobó que dichas estructuras repetitivas se encontraban en numerosos genomas bacterianos.

Finalmente, en 2003, tras la identificación por el grupo del doctor Jansen (Universidad de Utrecht, Países Bajos) de los genes Cas (CRISPR-associated genes) localizados al lado de estas regiones CRISPR, el sistema CRISPR/Cas fue propuesto por Mojica como un **sistema de defensa de las bacterias frente a la infección por fagos**. Para ello, no se fijó en las secuencias conservadas repetidas en tándem, sino en las regiones variables que aparecían entre ellas. Estas secuencias resultaron ser similares al genoma de ciertos fagos.

FIGURA 1. CRONOLOGÍA DEL DESCUBRIMIENTO DE LA TÉCNICA CRISPR Y SUS PRIMERAS APLICACIONES EN PLANTAS.

- 1987 Identificación de elementos genéticos repetitivos en *E. coli* (Ishino et al)
- 2000 Identificación de elementos repetitivos en diferentes procariontas.
- 2002 Descubrimiento del sistema CRISPR-Cas.
- 2005 Se propone CRISPR como un sistema de inmunidad adaptativa.
- 2007 Evidencia experimental de que CRISPR confiere inmunidad adaptativa.
- 2010 Cas9 es guiada por crRNAs y crea roturas de doble cadena en el ADN.
- 2012 Doudna y Charpentier proponen CRISPR-Cas como potencial herramienta para la edición genética.
- 2013 Uso exitoso de CRISPR-Cas en plantas para la edición del genoma.
- 2021 Se comercializó el primer alimento editado por CRISPR.

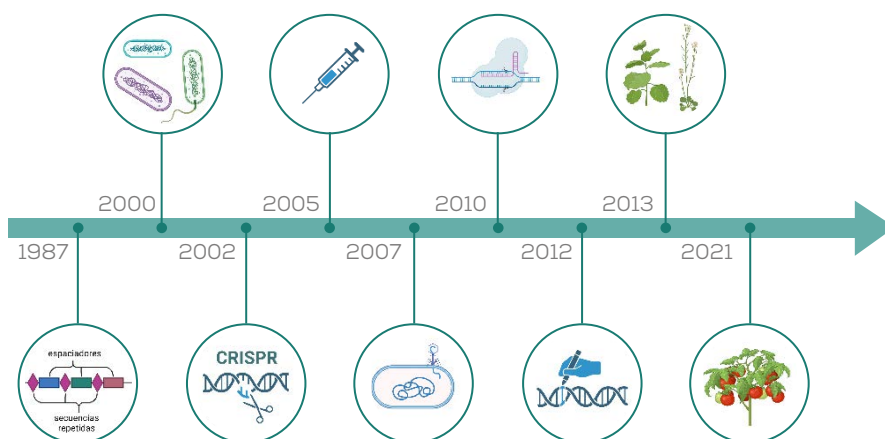
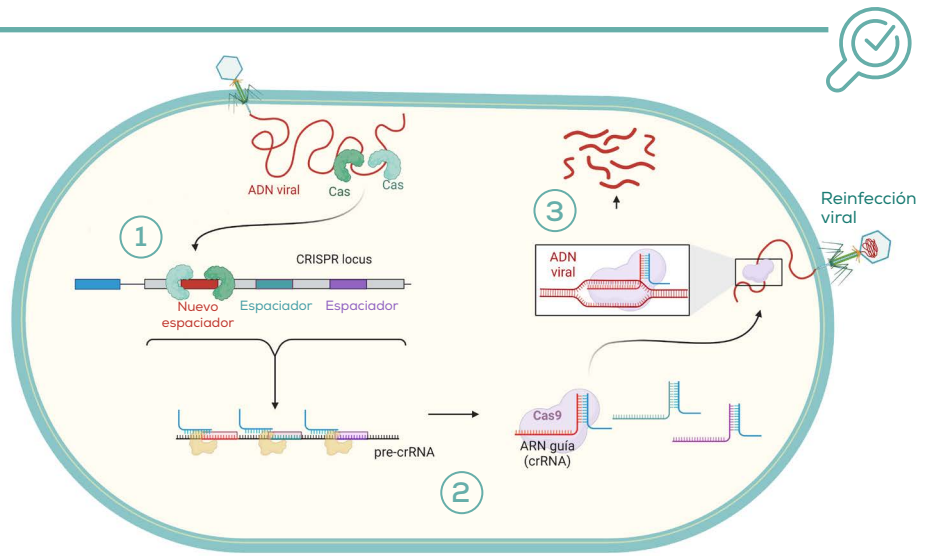


FIGURA 2. EL SISTEMA CRISPR/CAS ES UN SISTEMA DE DEFENSA DE LAS BACTERIAS FRENTE A LA INFECCIÓN POR FAGOS.

En la imagen se muestra el proceso mediante el cual una bacteria guarda parte del genoma de un fago en una primera infección, de forma que en sucesivas infecciones es capaz de reconocerlo y degradarlo, evitando así la infección.

- 1 Adquisición del ADN viral
- 2 Procesado del ARN CRISPR
- 3 Reconocimiento y degradación



Tal y como se representa en la **Figura 2**, cuando una bacteria es infectada por un fago, es capaz de guardar en su genoma un fragmento del ADN del mismo. De esta forma, si se produce una nueva infección, la bacteria reconoce el fago empleando esa secuencia de ADN y la utiliza para guiar a la proteína Cas para que corte el genoma del fago y lo degrade.

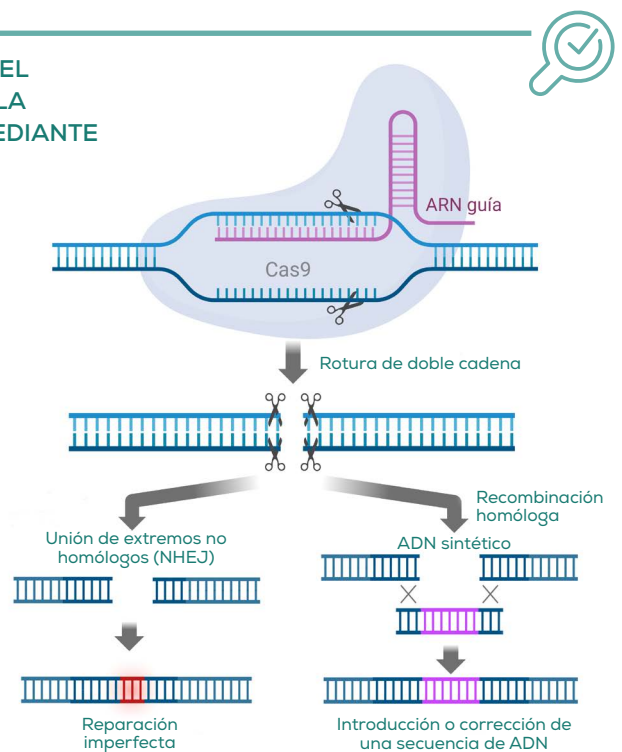
Basándose en este mecanismo, en 2012, las investigadoras Emmanuelle Charpentier (entonces en la Universidad de Umea, Suecia) y **Jennifer Doudna** (Universidad de California, Berkeley, Estados Unidos) demostraron que el complejo CRISPR-Cas9 podía ser reprogramado para cortar secuencias específicas de ADN en organismos distintos de las bacterias (**Jinek et al., 2012**).

Es decir, eligiendo y diseñando la secuencia de ARN que guía a la proteína Cas, podemos realizar cortes en el genoma de cualquier especie en la posición elegida (**Figura 3**). Por ello, ambas fueron galardonadas con el **Premio Nobel de Química en 2020**. Se puede encontrar más información sobre este descubrimiento en el libro **Editando genes: corta, pega y colorea**, del doctor Montoliu.

El sistema CRISPR/Cas es un sistema de defensa de las bacterias frente a la infección por fagos.

FIGURA 3. ESQUEMA DEL FUNCIONAMIENTO DE LA EDICIÓN GENÓMICA MEDIANTE CRISPR/CAS.

El ARN guía conduce a la proteína Cas hasta la zona del genoma complementaria para que realice el corte de las dos hebras. Posteriormente, al reparar ese corte se producen las mutaciones, bien por la reparación imperfecta de esa zona de corte o bien empleando un molde de ADN para incorporar la mutación deseada.





¿QUÉ ES EL GENOMA?

Las leyes de Mendel y la consiguiente mejora basada en el conocimiento científico han causado gran impacto en la producción y la seguridad alimentarias desde principios del siglo XX.

El **genoma** es el material genético en el que se escriben las instrucciones para construir un organismo y que funcione. Es como un manual de instrucciones escrito con cuatro letras, los nucleótidos. De forma muy simplificada, un fragmento de ADN (un gen) se **transcribe** a ARNm y este a su vez se **traduce** a proteína. Durante el proceso de traducción, la secuencia del ARNm se lee en grupos de tres letras (codón o triplete) que se corresponden con un aminoácido determinado —por ejemplo, el triplete AUG codifica para la metionina, y los tripletes UGU y UGC para cisteína—. Las proteínas son cadenas de aminoácidos de distintas longitudes y desempeñan numerosas funciones en la célula. De esta forma, cuando se produce un cambio o mutación en el ADN, el efecto sobre la secuencia de aminoácidos de la proteína puede variar en intensidad, tal y como se muestra en el símil de la **Figura 4**. Esto depende del número de nucleótidos que muten y de cuáles sean esos nucleótidos. Algunas mutaciones pueden tener un impacto significativo en la función de la proteína, mientras que otras pueden tener un efecto menor o incluso ser neutras.



FIGURA 4. EFECTO QUE PUEDEN PRODUCIR DISTINTOS TIPOS DE MUTACIONES SOBRE LA PAUTA DE LECTURA DE UNA MOLÉCULA DE ARNm.

Se muestra una frase compuesta por palabras de tres letras para simular los tripletes y el efecto que se genera al producirse una inserción o deleción de una única letra, la inserción de un triplete o la sustitución de una letra por otra.

¿CÓMO NOS PUEDE AYUDAR LA TÉCNICA CRISPR EN LA MEJORA GENÉTICA DE PLANTAS?

El origen de la mejora genética de plantas se remonta miles de años atrás, cuando los primeros agricultores comenzaron a practicar selección artificial. Al seleccionar y cultivar plantas con características deseables, se modificaban gradualmente las proporciones de las variantes genéticas (**alelos**) presentes en las poblaciones de plantas. A finales del siglo XVIII se generalizó la utilización de cruzamientos controlados, fundamentalmente en ornamentales y hortícolas, con el objetivo de obtener

nueva variabilidad de forma controlada sobre la que aplicar selección. Sin embargo, es desde el redescubrimiento de las **leyes de Mendel**, a principios del siglo XX, cuando la mejora basada en conocimientos científicos ha generado un profundo impacto en la producción mundial de alimentos y continúa jugando un papel fundamental en la seguridad alimentaria global.

Entre los métodos para generar nueva variación, la aplicación de

mutágenos, tanto físicos como químicos, ha sido de gran utilidad. Este enfoque implica inducir mutaciones en el material genético de las plantas para generar variabilidad genética y seleccionar aquellos individuos con características deseables. En la década de 1920 se comenzó a emplear **radiaciones ionizantes** para inducir mutaciones en plantas, y posteriormente, en la década de 1940, se exploraron otros agentes mutagénicos, como la colchicina y el etilmetanosulfonato (EMS).

Estos métodos permitieron crear **nuevas variedades de cultivos** con características mejoradas, como mayor rendimiento, resistencia a enfermedades y adaptación a diferentes condiciones ambientales. De hecho, la **Base de Datos FAO/OIEA sobre Variedades Mutantes** contiene información sobre más de 3.200 variedades mutantes distribuidas oficialmente de más de doscientas especies de plantas de todo el mundo. Sin embargo, con estas técnicas se producen mutaciones aleatorias en todo el genoma.

Con el sistema CRISPR, la proteína Cas es guiada por una molécula de ARN —diseñada para buscar la región que queremos modificar— y produce un corte de ambas cadenas de la hélice de ADN en ese punto (**Figura 3**). Las **mutaciones** se producen cuando la célula trata de reparar dicho corte para que la cadena no quede rota. Esta reparación se puede producir de dos formas distintas, según si añadimos o no un fragmento adicional con la mutación que queremos incorporar (en rosa, en la imagen). La forma más sencilla, sin añadir ADN adicional, es la que se conoce como *non-homologous end joining* (NHEJ). En el momento de la reparación es frecuente que se produzcan pequeños cambios, como la pérdida de algún nucleótido, lo



que provoca variaciones respecto a la secuencia original.

Según qué tipos de cambios se produzcan, el resultado será más o menos importante (**Figura 4**). Por ejemplo, si se produce un cambio de pauta de lectura —se eliminan o insertan nucleótidos que cambian la lectura de los tripletes originales—, es bastante probable que la proteína final no sea funcional. De hecho, esta vía, el «apagado» de genes mediante NHEJ, es la más simple y efectiva y la que más se ha utilizado hasta el momento, tanto para mejora como para investigación básica para estudiar las funciones de los genes en la planta.

Mención especial merece uno de los aspectos más destacables de esta herramienta, que es que podemos realizar mutaciones preci-

sas y específicas en los genes de interés sin dejar ninguna huella o marca detectable en el genoma después del proceso de edición. Es decir, sin alterar otras regiones del genoma y sin introducir secuencias adicionales de ADN. De este modo, la planta resultante sería completamente indistinguible de otra producida por una mutación espontánea en la naturaleza.

Esta herramienta permite la obtención de plantas editadas que son indistinguibles de mutaciones naturales.

Es fundamental invertir en ciencia básica para desarrollar ciencia aplicada. Es necesario identificar los genes que queremos editar.

RETOS DE FUTURO

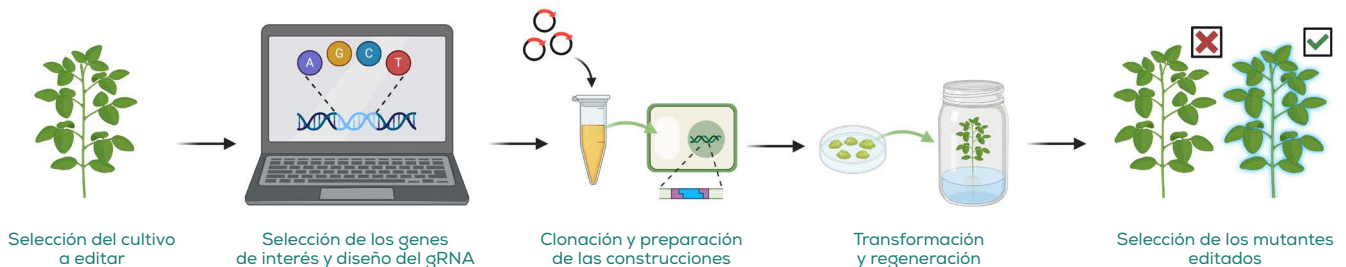
De acuerdo con la FAO, la **producción mundial de alimentos** debería aumentar un 50 por ciento para alimentar a los más de 9.700 millones de habitantes que vivirán en nuestro planeta en 2050. Además, debemos tener en cuenta las limitaciones existentes en cuanto a la escasez de terreno cultivable, el agotamiento de recursos y el impacto del cambio climático. En este contexto, las técnicas de edición genómica basadas en CRISPR son una nueva herramienta, como el desarrollo de las **técnicas de secuenciación masiva** y **herramientas bioinformáticas**, para ayudar a la mejora genética a

alcanzar los objetivos de forma más rápida. Sin embargo, la aplicación de esta técnica requiere el conocimiento de las bases moleculares de caracteres de interés agronómico (**Figura 5**). Es decir, si no conocemos qué genes están involucrados en el control del carácter de interés, no sabremos qué editar. Por ello, es fundamental invertir en ciencia básica para desarrollar ciencia aplicada. Además, este conocimiento es desigual entre las distintas especies, y en muchos casos estamos lejos de saber qué genes editar o cómo regenerar una planta completa después del proceso de edición.



FIGURA 5. PROCESO DE EDICIÓN GENÓMICA PARA LA OBTENCIÓN DE PLANTAS CON ALGUNA NUEVA CARACTERÍSTICA DESEABLE.

Tras la elección de la especie/variedad, necesitamos conocer un gen responsable del control del carácter que nos interesa modificar. Una vez diseñado el ARN guía que llevará a la proteína Cas hasta la zona del genoma a editar, debemos introducirlo en la planta a editar. Tras un proceso de cultivo in vitro y regeneración de plantas, seleccionaremos aquellas con la edición buscada.



Este último punto es en la actualidad uno de los desafíos para la aplicación de CRISPR/Cas en plantas, tanto la incorporación a las células de los reactivos necesarios, como la regeneración de plantas completas. Por ello, la inversión en ciencia básica sigue siendo fundamental para el avance de la mejora genética vegetal y el uso de la edición genómica en la práctica.

Las aplicaciones de la edición genómica de plantas son innumerables:

adaptación, nuevas características, mejoras nutricionales, resistencias a estreses bióticos y abióticos, y otras que están por llegar. En la web del **Genetic Literacy Project** podemos encontrar un listado de los distintos cultivos editados que han sido aprobados a escala mundial. Por el momento, la lista de variedades aprobadas para su cultivo y comercialización es reducida, pero seguro que aumentará en breve, puesto que son muchos los productos que se encuentran en desarrollo.



Una investigadora en un invernadero de tomates editados genéticamente en Japón (foto: Universidad de Tsukuba).

CASOS DE ÉXITO



- En Japón, Sanatech Seeds desarrolló en 2021 el **tomate Sicilian Rouge High GABA**, con un alto contenido en ácido gamma-aminobutírico (GABA). Se trata del primer cultivo editado mediante CRISPR en ser comercializado en el mundo.
- En 2023, el **maíz con alto contenido en amilopectina** desarrollado por Corteva Agriscience se **unió a la lista de productos editados que pueden comercializarse en Japón**.
- La **banana de larga vida**, desarrollada por la empresa Tropic en 2023, obtuvo su **aprobación para su importación y propagación en Filipinas**. Al ralentizar el pardeamiento, se reduce el desperdicio alimentario y las emisiones de CO₂.
- A la espera de su aprobación comercial, destaca el **desarrollo de variedades de trigo sin gliadinas**, aptas para celíacos, por parte del doctor Barro (Instituto de Agricultura Sostenible de Córdoba).



La legislación y regulación de las plantas editadas genéticamente no es uniforme a escala mundial y supone en la actualidad la principal limitación para su implantación.

LA REGULACIÓN DEL USO DE CRISPR EN MEJORA

La legislación y regulación de las plantas editadas genéticamente no es uniforme a escala mundial y supone en la actualidad la principal limitación para su implantación. En la web del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación se puede consultar la **regulación en España**. Algunos países consideran que estas plantas están sujetas a regulaciones similares a los organismos modificados genéticamente (OMG), mientras que otros han establecido regulaciones más flexibles o exenciones específicas para estas plantas. En la web del **Genetic Literacy Project** se resumen las posiciones de los distintos países en cuanto a la regulación del uso de nuevas técnicas genómicas. Es importante resaltar, de nuevo, que se trata de una tecnología que permite generar mutaciones sin dejar rastro, de forma que podemos obtener variedades que serían indistinguibles de una variedad obtenida por mutación espontánea. De hecho, varios países clasifican las plantas editadas según si se utiliza o no ADN foráneo en su edición (**Figura 3**). En el caso más simple, donde no se emplea ADN externo, estas plantas no se consideran sujetas al marco regulatorio de los OMG.

Por el contrario, en julio de 2018, el **Tribunal de Justicia de la Unión Europea** (TJUE) dictaminó que los organismos obtenidos mediante mutagénesis se debían considerar

OMG y por tanto deben ser regulados por la Directiva de Liberación Deliberada 2001/18/EC. Puesto que una gran cantidad de variedades actuales de muchas especies vegetales se han obtenido mediante mutagénesis, tuvieron que incluir un anejo en el que incluyeron distintas técnicas tradicionales —radiación, agentes químicos, etc.— como seguras. Según esta sentencia, los organismos editados son considerados OMG. Cabe resaltar que la directiva que los regula se aprobó 12 años antes de que apareciera la tecnología CRISPR. Más recientemente, el 5 de julio de 2023, se publicó la **Propuesta de Reglamento** del Parlamento Europeo y del Consejo relativo a los vegetales obtenidos con determinadas nuevas técnicas genómicas y a los alimentos y piensos derivados, y por el que se modifica el Reglamento (UE) 2017/625. El 7 de febrero de 2024 se aprobó dicha propuesta en el Parlamento, pero aún queda un largo proceso legislativo para que sea real y los agricultores europeos tengan acceso a esta tecnología. En dicha propuesta, se regulan las plantas obtenidas mediante NGT dividiéndolas en dos grupos. Las plantas NGT-1, que se consideran «equivalentes a las plantas convencionales», son aquellas cuyas modificaciones genéticas (delimitadas en la propuesta) podrían haberse obtenido mediante métodos tradicionales. El resto de plantas entraría en el grupo de las NGT-2. Para

su comercialización y liberación al medio ambiente, las primeras seguirán un procedimiento de verificación, mientras que las segundas seguirán un procedimiento de autorización según la normativa de OMG, pero adaptada a su perfil de riesgo y con incentivos si persiguen objetivos de sostenibilidad. Ninguna de ellas estaría autorizada para producción orgánica. Es probable que se soliciten modificaciones en esta propuesta antes de su aprobación final, pero hay esperanza de que Europa no pierda de nuevo la oportunidad de adoptar las últimas herramientas biotecnológicas para la mejora genética vegetal. Esto permitirá que su agricultura sea más competitiva y sostenible, especialmente en un contexto donde estas innovaciones ya se están utilizando en otros países para producir nuevas variedades élite que no pueden distinguirse, mediante ningún tipo de análisis, de las obtenidas por métodos tradicionales.

>Autoras del artículo:

Elena Zuriaga y Ángela Polo-Oltra
Centro de Citricultura y Producción Vegetal. Institut Valencià d'Investigacions Agràries (IVIA).
garcia_zur@gva.es