FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

APLICACIÓN DE LA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL A LA BIOFORTIFICACIÓN DE ALIMENTOS

APPLICATION OF PLANT BIOTECHNOLOGY TO FOOD BIOFORTIFICATION

Samuel García García

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Junio, 2020

FIRMA DEL ALUMNO

Firmado: Samuel García García

En León, a 29 de Junio de 2020

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN 1

2. MÉTODOLOGÍA DEL TFG 5

3. ESTRATEGIAS DE MODIFICACIÓN GENÉTICA 5

3. APLICACIONES 9

3.1. ¿POR QUÉ EL ARROZ, LA PATATA, LA BATATA Y LA YUCA? 9

3.2. BIOFORTIFICACIÓN EN β-CAROTENO 11

3.3. BIOFORTIFICACIÓN EN VITAMINA B9 16

3.4. BIOFORTIFICACIÓN EN VITAMINA C 17

3.5. BIOFORTIFICACIÓN EN HIERRO Y ZINC 18

3.6. ANTINUTRIENTES 23

4. REGULACIÓN 24

5. CONCLUSIÓN 25

6. REFERENCIAS 25

RESUMEN

La biofortificación es una herramienta clave para solucionar el grave problema del déficit de micronutrientes en buena parte de la población mundial, el cual desemboca en varias enfermedades y muertes evitables. La biofortificación por métodos biotecnológicos consiste en la mejora del contenido de micronutrientes en los alimentos mediante transgénesis o edición génica. Estas técnicas han permitido mejorar la calidad nutritiva de cultivos como el arroz, la patata, la batata o la yuca, que suponen la principal fuente de alimentación en determinadas poblaciones humanas ubicadas principalmente en Asia y África. Los estudios se centran en elevar el contenido de vitaminas, hierro y zinc entre otros, pues sus carencias son las más relevantes y las que tienen un mayor índice de mortalidad. Entre las variedades desarrolladas destaca el arroz dorado, cuyo consumo ya ha sido aprobado en varios países. De este modo, el objetivo del presente trabajo es recopilar los principales experimentos realizados hasta la fecha y comprender la evolución y actualidad de la biotecnología aplicada a la biofortificación. Los próximos años serán claves a la hora de implementar estos avances en la sociedad y convencer a la opinión pública de su importancia.

Palabras clave: Déficit nutricional, Edición génica, Micronutrientes, Transgénesis

ABSTRACT

Biofortification is a key tool for solving the serious problem of micronutrient deficiency in a large part of the world's population, which leads to several preventable diseases and deaths. Biofortification by biotechnological methods consists of improving the content of these micronutrients in food through transgenesis or gene editing. These techniques have improved the nutritional quality of several crops, such as rice, potato, sweet potato and cassava, which are the main source of food in human populations located mainly in Asia and Africa. The studies focus on raising the content of vitamins, iron and zinc among others, since their deficiencies are the most relevant and have a higher mortality rate. Among the varieties developed stands out golden rice, whose consumption has already been approved in several countries. In this way, the aim of this work is to compile the main experiments carried out to date and to understand the evolution and the present situation of biotechnology applied to biofortification. The next years will be key in implementing these advances in society and convincing public opinion of their importance.

Keywords: Nutrient deficiency, Gene editing, Micronutrients, Transgenesis

1. INTRODUCCIÓN

En este momento, 840 millones de personas pasan hambre en el mundo y 2.000 millones padecen cierto grado de inseguridad alimentaria, lo que supone más de un 25% de la población mundial. La inseguridad alimentaria engloba desde el hambre hasta la desnutrición. No es un suceso exclusivo de países en vías de desarrollo de África, Asia y América Latina, sino que en regiones más avanzadas como Norteamérica y Europa se estima en un 8%. Concretamente, el problema de la desnutrición afecta al 11% de la población mundial y está aumentando ligeramente en los últimos años tal como refleja la **Figura 1** (Food and Agriculture Organization of the United Nations *et al.*, 2019). La desnutrición hace referencia al déficit de macronutrientes y micronutrientes, de modo que éste último se conoce como hambre oculta o *hidden hunger*, y se caracteriza por ser asintomático hasta que pasa a estadíos más graves. Actualmente, el hambre oculta acarrea una mortalidad diaria de 24.000 personas (Majumder *et al.*, 2019). Más allá de la salud humana, también tiene una repercusión negativa en el desarrollo económico de los países y en la productividad de los trabajadores (Bailey *et al.*, 2015).

Así mismo, cabe mencionar que el sistema de producción agrícola desarrollado en los últimos años se ha caracterizado por potenciar exclusivamente el rendimiento para conseguir una producción mayor de los cultivos, descuidando de este modo la calidad en cuanto a los micronutrientes de los mismos, de forma que se induce una deficiencia en los consumidores y se potencia el hambre oculta (Garg *et al.*, 2018).

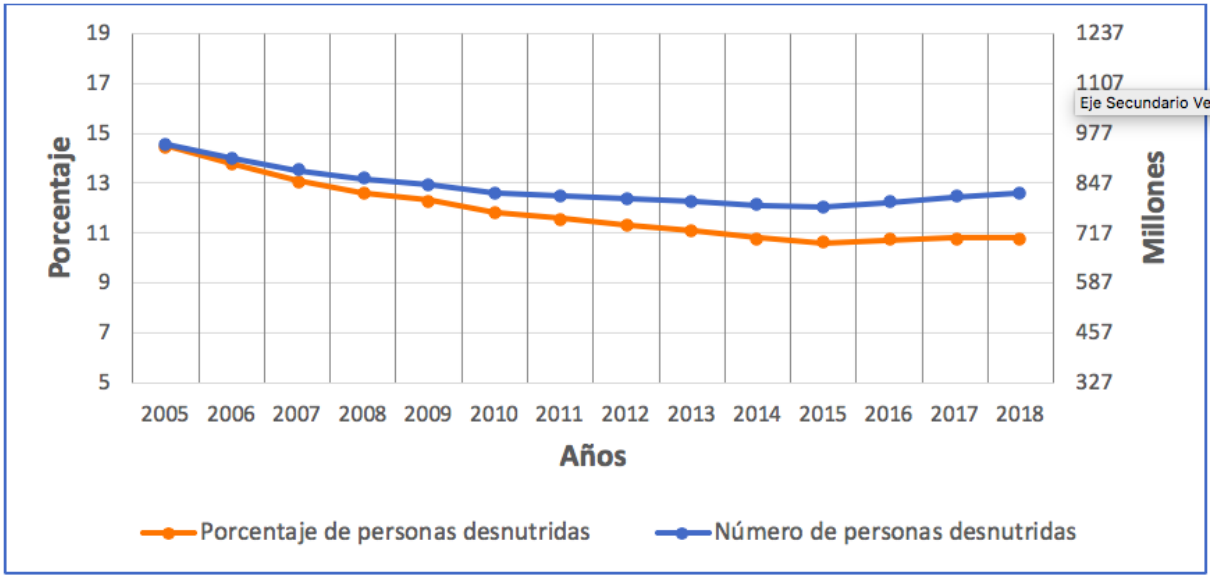

Figura 1. Variación en el porcentaje y el total de personas desnutridas a nivel mundial. Los datos referidos al año 2018 son una proyección, no son mediciones reales. Modificado de Food and Agriculture Organization of the United Nations *et al.* (2019).

Los micronutrientes son vitaminas y minerales que se requieren en muy pequeñas cantidades (suponen menos del 1% del peso seco del cuerpo), pero que son esenciales para el correcto funcionamiento fisiológico. Su déficit supone en todos los casos un efecto negativo en la salud y en la calidad de vida (Bailey *et al.*, 2015). Los principales micronutrientes que necesitamos aportar a través de la dieta y las consecuencias originadas por su deficiencia son los siguientes (A-F):

A) **Vitamina A (VitA)**: Tiene muchas funciones dentro del organismo pero su deficiencia se ha comprobado que afecta principalmente al sistema inmunitario, además de provocar ceguera en niños. Se estima que afecta a un tercio de todos los niños en edad preescolar en el mundo y que induce ceguera en 500.000 niños al año. En la dieta humana se adquiere en forma de β-caroteno o provitamina A (proVitA) proveniente de las plantas. En este caso destaca la biofortificación de muchos cultivos, entre ellos el arroz, el cual se ha modificado genéticamente para ser capaz de sintetizar y acumular altas cantidades de β-caroteno (Swamy *et al.*, 2019; World Health Organization, 2020).

B) **Folato o Vitamina B9 (VitB9)**: Es esencial para la síntesis de purinas y timidilato, participa en el metabolismo del carbono y en la metilación de ADN, entre otras funciones. En cantidades bajas en el organismo puede desembocar en anemia megaloblástica y durante la gestación, en deficiencias del tubo neural en el feto. Para aumentar sus niveles en plantas se trabaja en aumentar el flujo metabólico de síntesis y mejorar su almacenamiento (Bailey *et al.*, 2015; Gorelova *et al.*, 2017).

C) **Vitamina C (VitC)**: Su función en el organismo esta ligada al metabolismo de diferentes moléculas. Destaca su necesidad para la síntesis de colágeno y su función antioxidante. Su deficiencia produce escorbuto, una enfermedad que puede ser mortal (Strobbe *et al.*, 2018).

D) **Hierro (Fe)**: Su deficiencia es la más prevalente a nivel global. Según la organización mundial de la salud, 2.000 millones de personas tienen anemia, principalmente debido a la falta de Fe. Produce daños en el sistema endocrino e inmunitario, además de que supone un problema importante durante la gestación, pudiendo provocar malformaciones en el feto y complicaciones durante el parto. El principal mecanismo para la biofortificación de los cultivos en Fe es mejorar la absorción desde la rizosfera, su translocación a partes comestibles y su almacenamiento (Bailey *et al.*, 2015; Ludwig y Slamet-Loedin, 2019; Majumder *et al.*, 2019; World Health Organization, 2020).

E) **Zinc (Zn)**: Actualmente el 17,9% de la población tiene deficiencias de Zn y supone la muerte de 400.000 niños al año. Es clave para el funcionamiento de más de 200 enzimas,

además de tener un papel fundamental en el sistema inmune, la división celular y la síntesis proteica y de ADN. Además hay que tener en cuenta que el ser humano no es capaz de almacenarlo a largo plazo, por lo que se requiere de una ingesta cotidiana. Al igual que el Fe, se busca mejorar su absorción desde el suelo (Bailey *et al.*, 2015; Hefferon, 2019).

F) **Yodo (I):** Participa principalmente en la síntesis de la hormona tiroidea, la cual regula el desarrollo y crecimiento humano. Su deficiencia produce hipotiroidismo. Una vez más, tiene gran relevancia en embarazadas, ya que la hormona tiroidea es esencial en la formación del sistema nervioso central del feto (Bailey *et al.*, 2015).

Según los Institutos Nacionales de la Salud, la ingesta diaria recomendada (DRI) es la cantidad mínima de cada nutriente que debe consumirse para mantener una buena salud. Sus valores para algunos de los micronutrientes más importantes se reflejan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. DRI de micronutrientes para hombres y mujeres adultos (19-30 años). Modificado de National Institutes of Health (2020).

MICRONUTRIENTE	DRI (mg/día)	
	Hombre	Mujer
VitA	0.90	0.70
VitB9	0.40	0.40
VitC	90	75
Fe	8	18
Zn	11	8
I	0.15	0.15

La biofortificación, que se define como el incremento de los niveles de micronutrientes de los cultivos mediante métodos agronómicos, de mejora genética clásica o biotecnológicos, es una técnica capaz de paliar la falta de micronutrientes en ciertos sectores de la población mundial (Bouis, 2002). La biofortificación de alimentos no sólo busca aumentar la concentración de los micronutrientes, tal y como se ha mencionado, sino también reducir la presencia de antinutrientes. Éstos son moléculas que interfieren en la absorción de los micronutrientes. Una de las más importantes es el ácido fítico o fitato, que es un agente quelante de cationes el cual se acumula rápidamente durante la maduración de las semillas. Forma complejos insolubles con el Fe o el Zn, disminuyendo su biodisponibilidad. Además también existen otros antinutrientes como son los inhibidores de proteasas o los polifenoles (Garg *et al.*, 2018).

Para la obtención de cultivos biofortificados, existen 3 métodos principalmente:

A) Biofortificación agronómica: Consiste en la aplicación de fertilizantes sobre el suelo o las hojas que aportan directamente los minerales o mejoran su solubilización/movilización.

Adicionalmente se utilizan microorganismos que potencian dicha movilización. Su éxito se ve muy limitado por las características particulares de cada mineral, especie vegetal y composición del suelo, requiere de una aplicación constante, no permite dirigir la acumulación del micronutriente a partes comestibles y conlleva efectos medioambientales negativos (Garg *et al.*, 2018).

B) **Mejora convencional:** Basada en la mejora genética clásica. Se realizan cruzamientos entre líneas parentales productoras de cantidades especialmente elevadas de determinados nutrientes durante varias generaciones hasta conseguir líneas superproductoras. Esto sólo se puede hacer cuando existe una importante diversidad genética (Garg *et al.*, 2018). Otras limitaciones son los largos períodos de cultivo, los efectos epigenéticos y sobre el fondo genético, y la imposibilidad de controlar la acumulación de un nutriente en un órgano determinado (Kumar *et al.*, 2019).

C) Ingeniería genética: Aquí se incluyen las modificaciones biotecnológicas que implican modificaciones genéticas. Abarcan desde las plantas transgénicas hasta las que han sido editadas genéticamente. Gracias a estas técnicas, el ser humano es capaz de sobreponerse a las limitaciones de las anteriores estrategias de biofortificación. Hacen posible aumentar los niveles de micronutrientes, incluso producirlos en especies incapaces de forma natural, controlar su movilización a partes comestibles, reducir la presencia de antinutrientes, etc. Por otro lado, a pesar de la inversión inicial que supone en cuanto a investigación, se rentabiliza a largo plazo pues las plantas una vez modificadas no requieren tratamientos especiales (Garg *et al.*, 2018). De hecho se estima que cada dólar invertido en investigación supone a posteriori un ahorro de 17$ (Simkin, 2019). Debido a estas ventajas, este trabajo se va a centrar en los métodos biotecnológicos a la hora de analizar el presente y futuro de la biofortificación en el mundo.

El **objetivo general** del presente trabajo consiste en realizar una revisión bibliográfica sobre el desarrollo y actualidad de los cultivos biofortificados mediante técnicas biotecnológicas, haciendo especial hincapié en el arroz, la patata, la batata y la yuca. En primera instancia se describirán las técnicas requeridas para conseguir una planta biofortificada. Seguidamente, se tratarán los múltiples estudios en los que se aplica esta tecnología sobre los cultivos mencionados. Finalmente se expondrá el contexto legislativo en el que se enmarcan las referidas investigaciones y la comercialización de las líneas biofortificadas.

2. MÉTODOLOGÍA DEL TFG

El contenido íntegro de la presente revisión ha sido desarrollado utilizando el software de edición de texto Microsoft Word 2016. La bibliografía utilizada ha sido seleccionada a través de los siguientes buscadores:

1. Google académico (https://scholar.google.es/).
2. Pubmed (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed).
3. Science direct (https://www.sciencedirect.com/).

De forma global, el periodo de realización del presente trabajo puede dividirse en una serie de fases. La primera fue la búsqueda de revisiones generales sobre el tema, dando preferencia a aquellas más recientes y de revistas científicas con mayor prestigio. En una segunda fase, se organizó el contenido en apartados y se seleccionaron artículos científicos más concretos sobre cada uno de ellos. En tercer lugar, una vez leído y comprendido el contenido de los mismos, se procedió a la redacción ordenada de cada uno de los puntos a la par que continuaba la búsqueda de nueva información sobre cuestiones concretas que iban surgiendo. La cuarta fase consistió en la elaboración de una breve conclusión. Finalmente, se implementaron las tablas y figuras necesarias y se revisaron los aspectos formales relacionados con el formato del trabajo.

3. ESTRATEGIAS DE MODIFICACIÓN GENÉTICA

Como se ha mencionado anteriormente, existen en la actualidad 2 métodos biotecnológicos principales a través de los cuales se persigue mejorar la calidad nutritiva de algunas plantas. Por un lado la transgénesis, que consiste en la introducción de nuevo material genético en el genoma de una planta (Garg *et al.*, 2018). Por otro la edición genética, destacando la aplicación del sistema CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), que permite manipular el genoma de una forma mucho más versátil y realizar inserciones, deleciones y sustituciones de genes, entre otras posibilidades (Liu *et al.*, 2017). Ambos métodos suponen una alternativa frente a la mejora genética tradicional, sobre todo para cultivos sin suficiente diversidad natural, que se propagan asexualmente o que muestran incompatibilidad sexual con especies relacionadas (Kumar *et al.*, 2019).

A la hora de desarrollar plantas modificadas genéticamente, hay que partir de 2 premisas importantes: (1) se debe seleccionar un cultivo con importancia económica y muy adaptado; (2) los nutrientes de interés deben acumularse en una parte comestible de la planta sin que esto conlleve un efecto negativo a su desarrollo o al rendimiento económico (Vanderschuren *et al.*, 2013). Para biofortificar estos cultivos, se llevan a cabo modificaciones que afectan a la

distribución de los micronutrientes entre los diferentes tejidos, que incrementan determinadas rutas metabólicas en los tejidos comestibles, se reconstruyen rutas metabólicas completas, se potencia la biodisponibilidad de algunos nutrientes, se favorece la acumulación de los mismos, etcétera (Das *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2019).

La creación de plantas transgénicas requiere un proceso de transformación por el cual se introduce el material genético exógeno en las células. Para ello se pueden utilizar métodos directos o indirectos. Entre los primeros se encuentran la electroporación, la biolística, la transformación mediada por polietilenglicol, y la microinyección. En la electroporación se aplican potentes campos eléctricos en una solución que contiene los protoplastos y el DNA con el que se quieren transformar. La biolística consiste en bombardear las células vegetales con unas partículas de oro o tungsteno cubiertas del DNA de interés (Barampuram y Zhang, 2011). Ambos mecanismos se muestran esquematizados en la **Figura 2**.

Los métodos indirectos requieren del empleo de algún intermediario. El que sin duda ha tenido más éxito es la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, dónde la bacteria se utiliza como vector biológico (Ji *et al.*, 2013). *A. tumefaciens* es una bacteria gram– que induce tumores en las plantas que infecta. La causa es su plásmido Ti, el cual contiene 3 regiones: T-DNA, región de virulencia y región de los genes para el catabolismo de opinas. El T-DNA es la región que se transfiere a la célula infectada e induce la tumoración debido a los genes de biosíntesis auxinas, citoquininas y opinas. Consta de unos 24.000 pares de bases y se encuentra flanqueada por unas secuencias repetidas a ambos lados. La región de virulencia codifica para los genes *vir*, que ayudan en la transferencia del T-DNA. Para la transformación con el plásmido Ti se utiliza el plásmido natural pero desarmado, es decir, sin los genes que inducen tumoración, los cuales se reemplazan por un reporter y el gen de interés (Barampuram y Zhang, 2011; Low *et al.*, 2018).

A partir del plásmido Ti de *A. tumefaciens* se han desarrollado mediante ingeniería genética diferentes vectores para la transformación de plantas, pero los más versátiles y utilizados son los llamados vectores binarios. Estos están formados por 2 plásmidos que se nombran como vector binario y vector *helper* (**Fig. 3**), que se replican de forma independiente. El vector binario incluye el T-DNA y el origen de replicación de *A. tumefaciens* y *Escherichia coli*. El *helper* es un plásmido Ti sin la región T-DNA. Ambos se transfieren a *A. tumefaciens* para la transformación. Para transformar los tejidos de plantas, éstos se cocultivan con la cepa de *A. tumefaciens* poseedora del vector. En el medio de incubación suelen agregarse moléculas señal como la acetosiringona y se hacen heridas en el tejido para activar el sistema de virulencia de

A. tumefaciens. Una vez finalizado el proceso, los tejidos se cultivan en un medio que contiene el agente de selección de células transformadas y las hormonas vegetales necesarias para la regeneración de plantas transgénicas completas. Además se añaden antibióticos para eliminar las células de *A. tumefaciens* (Granados Díaz y Chaparro-Giraldo, 2012).

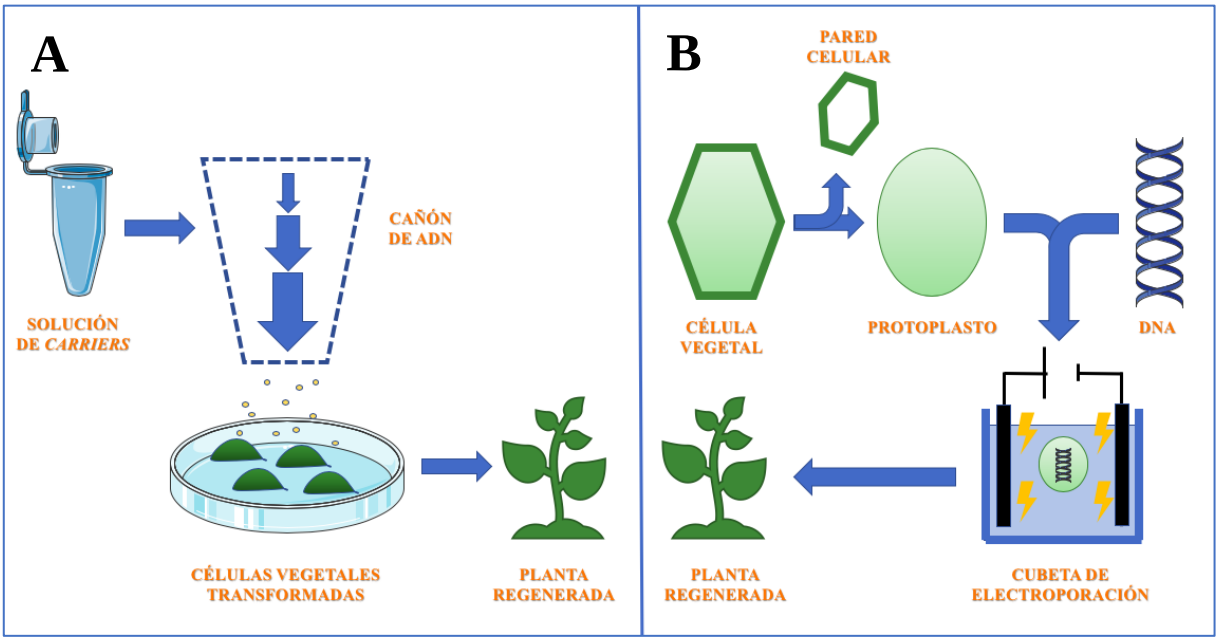

Figura 2. Métodos directos de transformación aplicados para obtener plantas transgénicas: (A) Biolística (B) Electroporación.

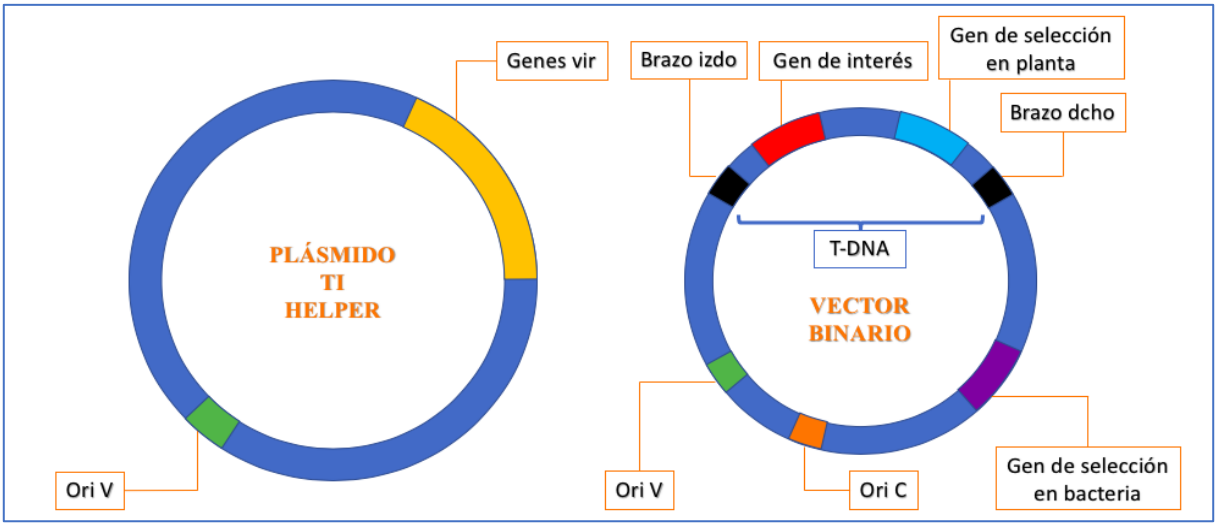

Figura 3. Elementos genéticos de un vector binario de transformación característico de las cepas recombinantes de *A. tumefaciens* utilizadas en los métodos indirectos o biológicos de transformación. Ori V es el origen de replicación en *A. tumefaciens* y Ori C en *E. coli*.

Además de cómo directos e indirectos, los métodos de transformación se clasifican según persigan la expresión transitoria o estable del DNA foráneo, siendo la segunda la necesaria para la obtención de una planta transgénica y, por tanto, la única que suscita de interés en el campo de la biofortificación. En dicho caso se deben cumplir 2 fases: (1) introducción del DNA en las

células (único requisito para una transformación transitoria), e (2) integración del DNA foráneo en el genoma. Este segundo paso es el que va a permitir que el individuo transgénico transmita la modificación a sus progenitores (Altpeter *et al.*, 2016). La transformación mediada por *A. tumefaciens* es la más indicada en estos casos, dado que permite la integración y expresión estable de copias únicas de material genético (Granados Díaz y Chaparro-Giraldo, 2012).

En relación a CRISPR, es la técnica de edición genética más novedosa con la que se trabaja actualmente. El descubrimiento de este mecanismo ocurrió en 1987, cuando por primera vez se observaron unas secuencias repetidas en tándem flanqueadas por otras secuencias no repetitivas en *E. coli* (Ishino *et al.*, 1987), las cuales se identificaron más adelante con secuencias de fagos y se acabó comprobando que formaban parte de un sistema de inmunidad bacteriana frente a virus. Dicho sistema se compone de un operón formado por el locus de CRISPR (secuencia líder, secuencias repetidas y secuencias únicas o espaciadores) y otros genes asociados (proteínas Cas). Las secuencias espaciadoras tienen su origen en el genoma de un virus o plásmido intruso, del que se ha extraído durante una primera infección. Su almacenamiento tiene el objetivo de bloquear una hipotética segunda infección (Mojica *et al.*, 2005; Barrangou *et al.*, 2007). Este mecanismo consta de 3 fases: adaptativa (se inserta una secuencia del DNA intruso en el clúster), de expresión (se transcribe el crRNA con la secuencia de los espaciadores) y de interferencia (reconocimiento del DNA foráneo y corte por nucleasas Cas) (Jinek *et al.*, 2012).

Actualmente se conocen 3 tipos de CRISPR/Cas: I, II y III. El CRISPR/Cas9 de tipo II es en el que recae mayor interés y la mayoría de estudios. Su característica diferencial frente a los otros tipos es la presencia de la endonucleasa Cas9, de un tracrRNA (*trans-activating* crRNA) y una RNAsa III (Ribonucleasa III) (Liu *et al.*, 2017). En este caso, el tracrRNA es otra secuencia no codificante que se transcribe y procesa por la RNAsa III, permitiendo a su vez el correcto procesamiento del crRNA. Ambos RNAs forman un complejo que guía a Cas9 para que realice una rotura del DNA de doble cadena en la zona de hibridación. Cada uno de los 2 dominios de Cas9 (HNH y RucV-like) corta una de las cadenas del DNA foráneo (Jinek *et al.*, 2012).

El sistema CRISPR/Cas9 se ha desarrollado rápidamente y se está aplicando con éxito en la modificación de rutas metabólicas y en la mejora de la calidad de los cultivos vía mutaciones, silenciamiento génico y regulación transcripcional. Para su uso en biotecnología se emplean unas secuencias guía de RNA (sgRNA) que aúnan las funciones del tracrRNA y el crRNA. Se sintetizan fácilmente y componen de unos 100 nucleótidos, cuyo extremo 5´ tienen 20 nucleótidos complementarios a la secuencia de DNA que se quiere modificar y un bucle en el

extremo 3´que ancla la proteína Cas9. Una vez que Cas9 ejecuta el corte, se inician los mecanismos de reparación celular (**Fig. 4**). El primero y más común es *nonhomologous end-joining* (NHEJ), cuya acción suele originar un *knockout* (pérdida de función de un gen). El otro mecanismo se conoce como *homology-directed repair* (HDR) y permite la inserción o reemplazamiento de genes (Liu *et al.*, 2017).

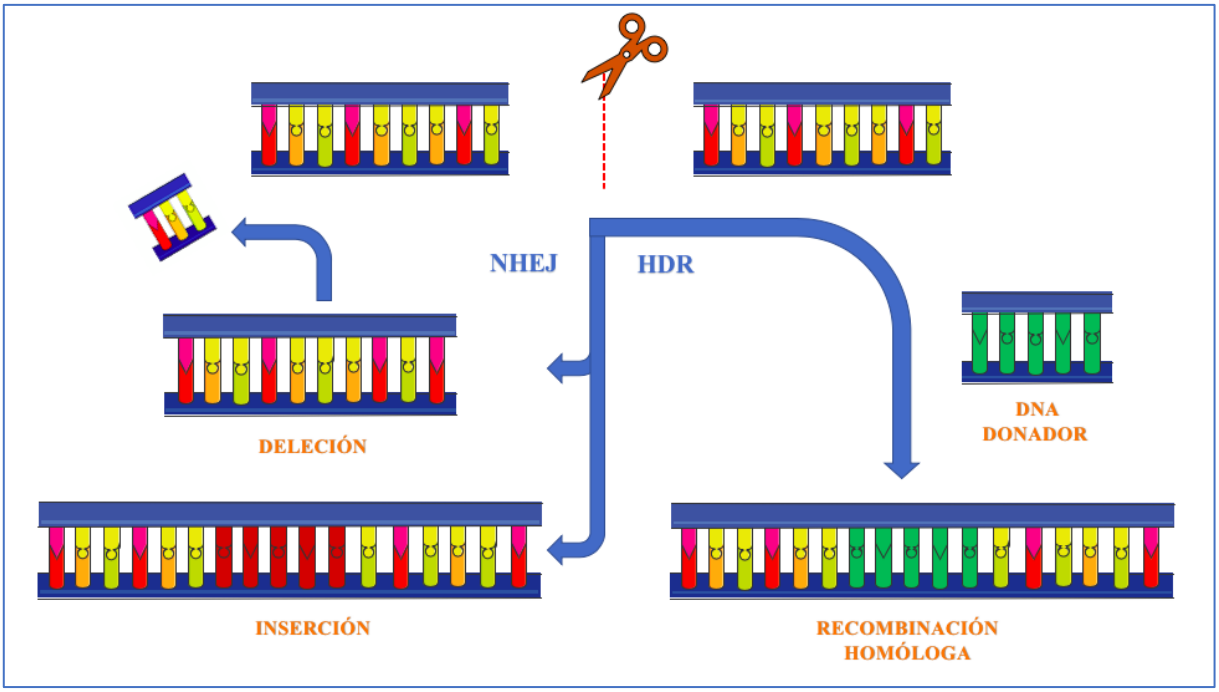

Figura 4. Esquema de los 2 mecanismos de reparación de DNA tras la rotura de la doble cadena por Cas9.

3. APLICACIONES

3.1. ¿POR QUÉ EL ARROZ, LA PATATA, LA BATATA Y LA YUCA?

El sustento nutritivo de gran parte de la población mundial deriva únicamente de los cultivos autóctonos, debido principalmente a la pobreza. Como consecuencia de este déficit en la variedad alimentaria, se producen carencias de distintos micronutrientes con su consecuente efecto sobre la salud (Majumder *et al.*, 2019). Desde el punto de vista de la investigación interesa por lo tanto mejorar aquellos cultivos que suponen una fuente de alimento clave para muchas personas, seleccionando de entre ellos aquellos que tengan un bajo contenido en algunos de los micronutrientes más necesarios. Tres de los cultivos que cumplen estos dos requisitos son el arroz, la patata, la batata y la yuca.

El **arroz** es un alimento básico y principal en la dieta para más de 3.000 millones de personas, de manera que aporta hasta el 70% de las calorías diarias para más de la mitad de la población mundial (Mishra *et al.*, 2018). La parte comestible de la planta de arroz (*Oryza sativa* L.) es su

semilla, formada en su mayor parte por el endospermo. La semilla de arroz es deficiente en varios micronutrientes como Zn, Fe y proVitA, excepto en la capa de la aleurona. Sin embargo, ésta última tiene escasa representación en la semilla y además se pierde durante el cocinado (Johnson *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2013; Jena *et al.*, 2018).

La **patata,** que es el tubérculo de la planta conocida con el mismo nombre (*Solanum tuberosum* L.), representa la cuarta fuente de calorías más importante a nivel mundial (Garg *et al.*, 2018). Los únicos cultivos más importantes son el arroz, el maíz y el trigo, aunque la patata contiene más vitaminas y minerales. Otra ventaja es su escaso tiempo de cultivo y la elevada adaptabilidad, lo que facilita su plantación en diferentes climas y entornos (Hameed *et al.*, 2018). La patata tiene suficiente concentración de Fe (10,4 μg/g en peso fresco (pf)), mayor que el arroz, por lo que su biofortificación en este elemento no es un objetivo para los científicos. Sin embargo, sí interesa su enriquecimiento en otros componentes cuyo contenido es menor como son el Zn (4,1 μg/g pf), la vitC (0,17 mg/g pf), carotenoides (3,3 μg/g pf) de los cuales β-caroteno (0,14 μg/g pf) y la VitB9 (0,12 μg/g pf) (Burlingame *et al.*, 2009).

La **patata dulce** (*Ipomoea batatas* L.), también llamada **batata** o boniato, es el séptimo cultivo básico más importante del mundo, destacando su relevancia en Asia y África. Guarda algunas similitudes con la patata como el hecho de que la parte comestibles es un tubérculo. En estos últimos años ha ganando peso debido a que es una buena fuente de proVitA, teniendo variedades obtenidas mediante biofortificación convencional con una concentración superior a 100 μg/g pf de β-caroteno. Además aporta otros micronutrientes importantes como la VitC (155-322 μg/g pf), Fe (6,2-12,6 μg/g pf) o Zn (3,7-6,9 μg/g pf) (Laurie *et al.*, 2015). Estos valores son aceptables pero se busca mejorarlos todavía más por técnicas biotecnológicas.

Lo que se conoce comúnmente como **yuca** o mandioca es la raíz de una planta denominada *Manihot esculenta* Crantz. Su cultivo es especialmente importante en África dado que la planta es bastante resistente a la sequía y las plagas y el consumo de su raíz proporciona más energía por unidad de área cultivada que cualquier otro cultivo (Sayre *et al.*, 2011). Por estos motivos es la fuente principal de alimento para 800 millones de personas (Narayanan *et al.*, 2019). Sin embargo, una dieta basada exclusivamente en yuca aporta únicamente entre el 10-20% del Fe, Zn y VitA recomendado. Además tiene un aporte proteico muy bajo y niveles tóxicos de linamarina, que si no es eliminada, puede producir graves enfermedades e incluso la muerte. Otras limitaciones del cultivo son la escasa vida media de las raíces una vez cosechadas y la enfermedad del mosaico de la yuca, producida por un geminivirus. A parte de todos los estudios

existentes para la biofortificación de la yuca, existe el programa *BioCassava Plus* (BC+), impulsado por la *Bill and Melinda Gates Foundation*, cuyo objetivo es acabar con la malnutrición en la África Subsahariana a través de una dieta basada en yuca biofortificada (Sayre *et al.*, 2011).

3.2. BIOFORTIFICACIÓN EN β-CAROTENO

Como ya se ha tratado anteriormente, el β-caroteno o proVitA es una molécula clave para el ser humano y se obtiene por la dieta. Su síntesis en plantas ocurre en los platidios (Sun *et al.*, 2020). Las enzimas e intermediarios que la componen se representan en la **Figura 5**.

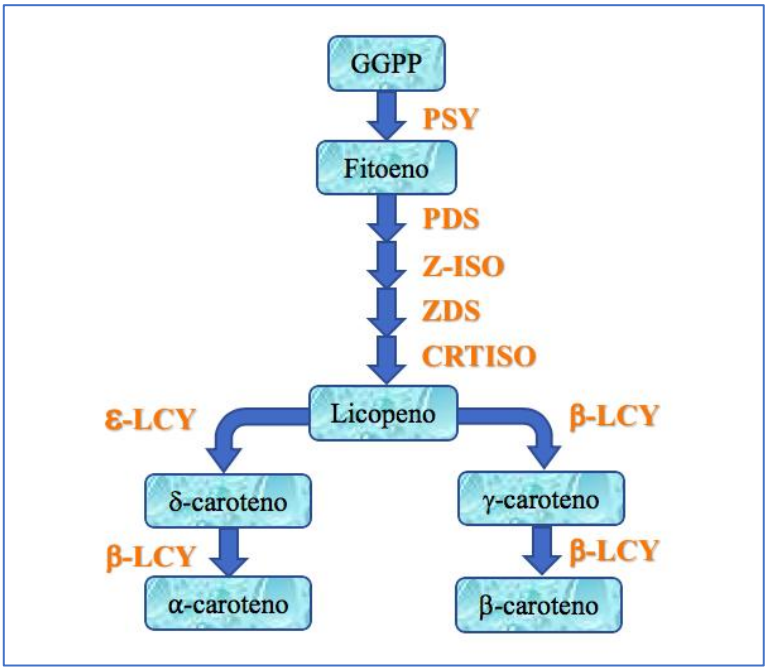

Figura 5. Ruta metabólica esquemática de síntesis de β-caroteno en organismos vegetales. GGPP, geranilgeranil difosfato; PSY, fitoeno sintasa; PDS, fitoeno desaturasa; Z-ISO, zeta-caroteno isomerasa; ZDS, zeta-caroteno desaturasa; CRTISO, prolicopeno isomerasa; ε-LCY, licopeno ε-ciclasa, β-LCY, licopeno β-ciclasa.

En **arroz**, la síntesis de proVitA está bloqueada en el endospermo a nivel de la fitoeno sintasa (PSY), de forma que no se sintetiza β-caroteno y se acumula su precursor geranilgeranil difosfato (Bai *et al.*, 2016). El arroz dorado es un cultivo transgénico cuyo genoma ha sido modificado para que el endospermo sea capaz de sintetizar β-caroteno. Esta variedad fue desarrollada en la década de 1990 por los científicos alemanes Ingo Potrykus y Peter Beyer y financiada por la Fundación Rockefeller, la Unión Europea y la Escuela Politécnica Federal de Zúrich (Jena *et al.*, 2018). La primera publicación sobre el arroz dorado data del año 2000, en la revista Science (Ye, 2000).

Potrykus y Beyer utilizaron un sistema de transformación mediada por *A. tumefaciens* para introducir la ruta biosintética completa de β-caroteno en el endospermo de la variedad de arroz *O. sativa japonica* cv. Taipei 309 de 2 maneras distintas:

a) Por un lado transformaron con el vector pB19hpc, en el que incluyeron el gen *PSY* de *Narcissus pseudonarcissus* bajo el control de un promotor específico de endospermo (GtI) y el gen de la fitoeno desaturasa (*CrtI*) de *Erwinia uredovora* bajo el control del promotor constitutivo 35S del virus del mosaico del tabaco (CaMV). El vector incluía además el gen de selección *aphIV* con el promotor CaMV 35S.

b) Por otro lado, llevaron a cabo la cotransformación con 2 vectores: 1) el pZPsC con los mismos genes *PSY* y *CrtI* y 2) el vector pZLcyH que incluía a mayores el gen de la licopeno β-ciclasa (*LCY-β*) de *N. pseudonarcissus* y el gen de selección *aphIV* (Ye, 2000).

En ambos casos se obtuvieron líneas transgénicas con semillas enriquecidas en β-caroteno lo que provocó que éstas tuvieran un tono amarillento (**Figura 6)**. Sin embargo, posteriormente se descubrió la existencia de licopeno ciclasas en arroz que permiten la formación de β-caroteno a partir de licopeno (Schaub *et al.*, 2005), lo que explicaba que los científicos obtuviesen β-caroteno incluso en la primera de las 2 transformaciones (Ye, 2000). El resultado de ésta dio lugar a la primera generación de arroz dorado (GR1), portadora exclusivamente de los genes *PSY* y *CrtI* mencionados ya que se había prescindido del gen *LCY-β*, y cuyo rendimiento en la síntesis de carotenoides fue de 1,6 μg por gramo de endospermo. En posteriores experimentos con otras variedades de arroz índico como IR64 y BR29, el total de carotenoides ascendía a 9,34 μg/g, de los cuales 2,32 μg/g y 3,92 μg/g correspondían a β-caroteno respectivamente (Datta *et al.*, 2006).

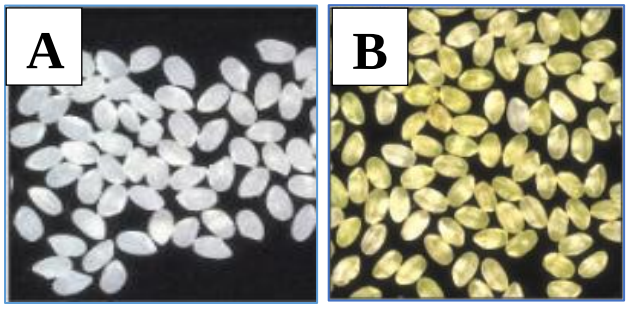

Figura 6. Fenotipo de las semillas de arroz control (A) y de la línea z11b cotransformada con pZPsC y pZLcyH (B) (Ye, 2000).

Años después surgió una 2ª generación de arroz dorado (GR2) en la que se sustituyó el gen *PSY* de *N. pseudonarcissus* por el de maíz (*ZmPSY1*) y se mantuvo el gen *CrtI* de *E. uredovora*, obteniendo un rendimiento en la síntesis de carotenoides de 37 μg/g, de los cuales 31 μg/g correspondían a β-caroteno (Paine *et al.*, 2005). Actualmente, el arroz dorado autorizado para su consumo en algunos países se denomina GR2E y posee el gen *PSY* de maíz y el gen *CrtI* de *Pantoea ananatis* (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, 2020).

Un estudio reveló que la ingesta de 100g de la variedad GR2 al día puede proveer entre 500 y 800 μg de retinol (derivado de la VitA), lo que supone hasta un 100% del requerimiento medio estimado (EAR) y hasta un 70% de la DRI para un adulto (De Steur *et al.*, 2017). Un análisis

de composición reciente realizado en la línea de arroz dorado GR2E, que cuantifica hasta 62 parámetros, no encontró ninguna diferencia significativa respecto a las variedades silvestres, a excepción únicamente del aumento en β-caroteno (Swamy *et al.*, 2019). En consonancia, los estudios toxicológicos efectuados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) no encontraron pruebas de efectos nocivos por el consumo de β-caroteno en dichas concentraciones (EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food, 2012). En los últimos 2 años, el arroz dorado ha sido aprobado para consumo en Estados Unidos, Canadá, Nueva Zelanda y Australia. En cuanto a su cultivo, Filipinas y Bangladesh son los países que se encuentran en fases más avanzadas, de hecho en este último la aprobación parece inminente (Majumder *et al.*, 2019; Stokstad, 2019; International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, 2020).

La edición genética también se ha utilizado para biofortificar el arroz en proVitA. Un estudio reciente propone una alternativa al arroz dorado basándose en el mutante *or* de coliflor (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), que presenta un color naranja debido a la acumulación de β-caroteno. Dicho estudio trata de mimetizar la mutación del gen *or* en arroz. Este gen codifica para una proteína con un motivo del tipo dedo de Zn. Su presencia favorece la diferenciación de cloroplastos a cromoplastos, lo que aumenta el efecto sumidero y estimula la acumulación de carotenos (Kim *et al.*, 2019). Además, se sabe que favorece la activación de la enzima PSY e inhibe la degradación del propio β-caroteno (Watkins y Pogson, 2020). En el trabajo se sintetizaron varios sgRNAs aberrantes con el objetivo de modificar el gen ortólogo en arroz (*Osor*) mediante CRISPR/Cas. A partir de las células mutadas se obtuvieron líneas de callos *Osor*_t3 que mostraron coloración naranja. El análisis de los transcritos dilucidó la presencia de fragmentos aleatorios del tercer intrón entre los exones 3 y 4 debido a fallos inducidos en el *splicing*. Además, el color naranja fue más intenso en los genotipos que presentaban errores *in frame*, como pequeñas deleciones o la inserción del fragmento del tercer intrón. Los callos reflejaron un máximo de 2,86 μg/g pf de β-caroteno, mientras que en el control los valores se encontraban por debajo del límite de detección (Endo *et al.*, 2019).

En el caso de la **patata**, los niveles de β-caroteno son insuficientes (0,14 μg/g pf) (Burlingame *et al.*, 2009). Uno de los primeros intentos de biofortificación consistió en sobreexpresar la fitoeno sintasa de *E. uredovora* (*CrtB*) bajo el control de un promotor específico de tubérculo en 2 variedades de patata con niveles indetectables de β-caroteno, como son *S. tuberosum* cv. Désirée (5,6 μg/g de carotenoides en peso seco (ps)) y *Solanum phureja* cv. Mayan Gold (20 μg de carotenoides/g ps). En la línea transgénica de la cv. Désirée se alcanzaron los 35 μg de

carotenoides/g ps, de los cuales 10 μg/g eran β-caroteno. Sin embargo, a pesar de que se superaron los 78 μg/g ps en la cv. Mayan Gold, el contenido en β-caroteno fue de únicamente 6,51 μg/g (Ducreux *et al.*, 2005). Por otra parte, la sobreexpresión del gen *StLCYb* correspondiente a la enzima LCY-β incrementó hasta 1,9 veces el contenido de β-caroteno de la misma variedad Désirée, sobrepasando los 2 μg/g ps. La presencia de LCY-β deriva el flujo metabólico hacia la síntesis de β-caroteno, tal y como se ve en la **Figura 5** (Song *et al.*, 2016). Al igual que en el caso del arroz dorado, las variedades de patata enriquecidas en β-caroteno presentan un tono amarillo más intenso (**Fig. 7**).

Figura 7. Sección del tubérculo de patata procedente de varias líneas transgénicas (1, 2 y 4) y de una planta control (C) (Song *et al.*, 2016).

Las estrategias basadas en el silenciamiento génico en lugar de la sobreexpresión también han tenido éxito en patata. Así, líneas de la variedad Désirée portadoras del cDNA antisentido del gen de la licopeno ε-ciclasa (*LCY-ε*) llegaron a multiplicar hasta 14 veces su contenido en β-caroteno. Al reducir los niveles de LCY-ε, el flujo de síntesis se redirecciona hacia la síntesis de β-caroteno (Diretto *et al.*, 2006). De forma similar, al silenciar el gen de la β-caroteno hidroxilasa que degrada el β-caroteno para convertirlo en zeaxantina, se consiguió alcanzar los 3,1 μg/g pf de β-caroteno en la variedad Yema de Huevo (Van Eck *et al.*, 2007).

En un último estudio, los autores transfirieron a plantas de patata de la variedad Désirée el gen *or* mutado de coliflor naranja que previamente se había reproducido artificialmente en arroz para su enriquecimiento en β-caroteno. El resultado fue el incremento en 6 veces de la concentración de carotenoides (31 μg/g ps) y hasta 5,01 μg/g ps de β-caroteno (Lopez *et al.*, 2008). Adicionalmente, al ser almacenados en frío durante unos meses después de su cosecha, la concentración de carotenoides se multiplicó hasta 10 veces (Li *et al.*, 2012).

En la **patata dulce** o **batata** también se ha intentado incrementar los niveles de β-caroteno mediante diversas modificaciones. Una de ellas se basa en la sobreexpresión de un nuevo alelo

del gen *LCYB*, llamado *IbLCYB2* y aislado de la línea de batata HVB-3, en la variedad Shangshu 19, un cultivo comercial con bajo contenido en carotenoides. La línea modificada fue capaz de duplicar el contenido de carotenoides (de 1,052 a 2,701 μg/g ps) y aumentar hasta 3,41 veces el contenido de β-caroteno (de 0,177 a 0,604 μg/g ps) (Kang *et al.*, 2018). En otro caso, la sobreexpresión del gen de la γ-caroteno desaturasa de batata (IbZDS) cv. Nongdafu 14, partícipe de la ruta de biosíntesis (**Fig. 5**), también resultó satisfactorio. Se duplicó el contenido en carotenoides (de 1,146 a 2,181 μg/g ps) y se cuatriplicó el de β-caroteno (de 0,276 a 1,095 μg/g ps) (Li *et al.*, 2017). Por otro lado, existen varios ensayos de *knockdowns* de genes (disminución de la expresión de un gen) de la ruta de síntesis de β-caroteno mediante RNA de interferencia (RNAi) que dan lugar al aumento en el contenido de proVitA (**Tabla 2**).

Otra modificación diferente con el mismo objetivo está relacionada de nuevo con el gen *or*. En este caso se ha mimetizado una mutación del gen *or* del melón naranja, el cual tiene un SNP (polimorfismo de un solo nucleótido) que causa la sustitución de una arginina por un histidina, lo que desencadena la acumulación masiva de carotenoides. Al expresar el gen *Ibor* mutado de la propia batata se lograron callos con 88,4 más β-caroteno que el control, demostrando la posible utilidad futura en la biofortificación del alimento (Kim *et al.*, 2019).

Tabla 2. Experimentos basados en la reducción de la expresión de genes relacionados con la ruta de síntesis de carotenoides mediante silenciamiento génico por RNAi.

Enzima	β-caroteno (aumento)	Variedad	Localización	Referencia
β-caroteno hidroxilasa	34,43 μg/g ps	Yulmi	callo	(Kim *et al.*, 2012)
Licopeno ε-ciclasa	19,26 μg/g ps (x21,4 ps)	Yulmi	callo	(Kim *et al.*, 2013)
Licopeno ε-ciclasa	(x6,59 ps)	Yulmi	raíz	(Ke *et al.*, 2019)
Licopeno β-ciclasa	(x1,8 ps)	Yulmi	callo	(Kim *et al.*, 2014)

Por último tenemos la **yuca**. Dentro del programa BC+, el aporte de proVitA es uno de los puntos clave. Para lograrlo, los investigadores se han focalizado en fortalecer el flujo metabólico de síntesis. Mediante la coexpresión del gen *CrtB* y el correspondiente de la enzima 1-deoxixilulosa-5-fosfato sintasa (DXS), ambos bajo el control de un promotor de patatina, se incrementó hasta 30 veces la concentración de carotenoides (de 2,5 a >50 μg/g ps), de los cuales el 90% eran β-caroteno. Dichos resultados se obtuvieron tanto en laboratorio como en ensayos de campo (Sayre *et al.*, 2011). Al igual que en los otros cultivos, la yuca enriquecida también adopta una coloración más intensa (**Fig. 8**). Previamente, en el año 2010, se averiguó que un SNP en el gen *PSY2* impulsaba la producción de β-caroteno hasta una concentración de 6,67

µg/g ps. Dicha mutación desemboca en un cambio en 1 de los aminoácidos, lo cual aumenta la actividad de la PSY (Welsch *et al.*, 2010).

Figura 8. Sección de la raíz de yuca procedente de una planta control (izquierda) y una línea transgénica (derecha) (Sayre *et al.*, 2011).

3.3. BIOFORTIFICACIÓN EN VITAMINA B9

Los folatos no son sintetizados por el ser humano y requieren de su ingesta en la dieta. La ruta de biosíntesis del folato en plantas ocurre entre el citosol, los plastidios y la mitocondria, tal y como se muestra en la **Figura 9.** En patata y arroz el contenido de tetrahidrofolato (forma reducida del ácido fólico) es relativamente bajo, unos 0,15 µg/g pf de patata y 0,08 µg/g pf de arroz, por lo que interesa su biofortificación en este compuesto (Strobbe y Van Der Straeten, 2017).

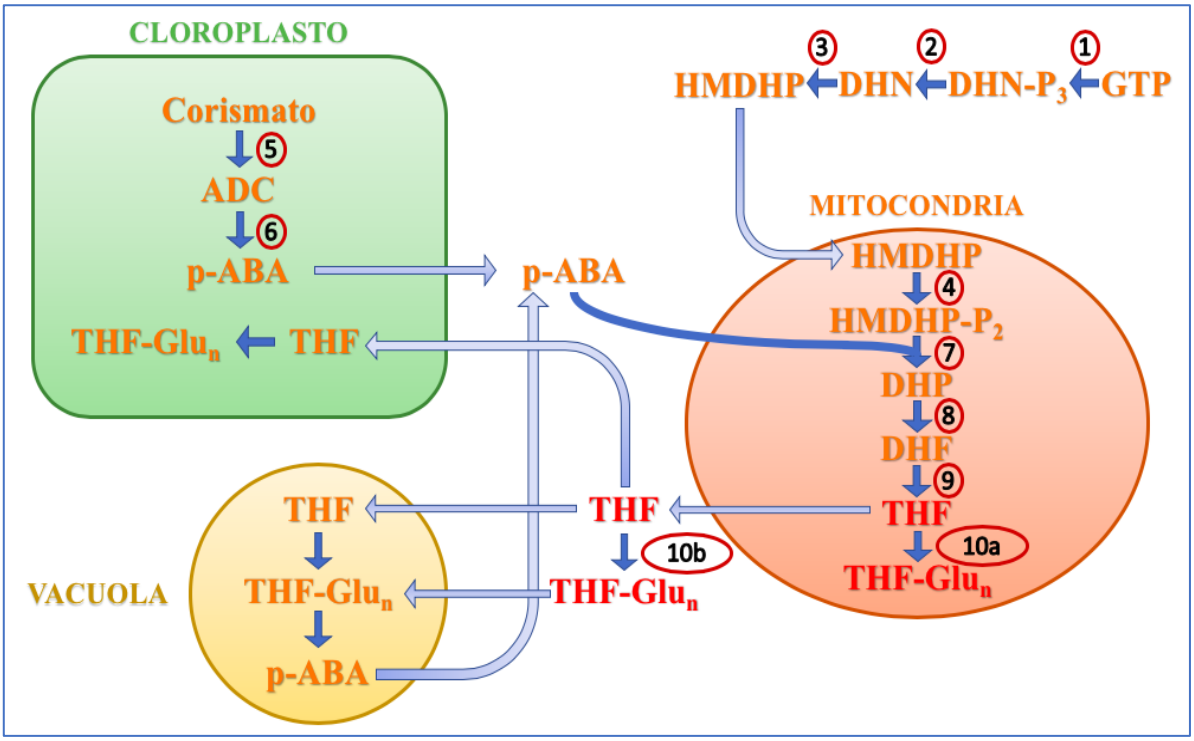

Figura 9. Representación esquemática de la ruta biosintética del folato en plantas. GTP, guanosina trifosfato; DHN-P_3, dihidroneopterina trifosfato; DHN, dihidroneopterina; HMDHP, 6-hidroximetilneopterina; HMDHP-P, 6-hidroximetilneopterina monofosfato; HMDHP-P_2, 6-hidroximetilneopterina pirofosfato; ADC, aminodeoxicorismato; p-ABA, para-aminobenzoato; DHP, dihidropteroato; DHF, dihidrofolato; THF, tetrahidrofolato; THF-Glu_n, tetrahidrofolato poliglutamado.

En el caso de la **patata**, los primeros estudios de sobreexpresión de enzimas de la ruta de síntesis de la VitB9 no resultaron efectivos. Uno de ellos concluyó que la sobreexpresión de las enzimas GTPCHI y ADCS, de *Arabidopsis thaliana* en la variedad de patata Désirée era insuficiente, puesto que apenas se triplicaba el contenido del folato. Estas enzimas están involucradas en la síntesis de 2 precursores, la pteridina y el ácido *p*-aminobenzoico respectivamente (**Fig. 9**). El fracaso pudo ser debido a que otras enzimas posteriores de la ruta actuaban a modo de cuello de botella (Blancquaert *et al.*, 2013). Buscando una solución, las líneas transformadas del experimento con mejores resultados, fueron retransformadas con los genes de las 2 enzimas que supuestamente limitaban el flujo metabólico: HPPK/DHPS y FPGS, las cuales catalizan las reacciones 4, 7 y 10a mostradas en la **Figura 9**. Como consecuencia se obtuvieron líneas con 12 veces más folato que las silvestres (0,17 μg/g ps), logrando hasta 1,93 μg/g ps de VitB9 (De Lepeleire *et al.*, 2018).

Al igual que en patata, en **arroz** se han realizado numerosos experimento de biofortificación en VitB9 dónde se ha comprobado que la sobreexpresión de 1 único gen de la ruta resulta ineficiente para aumentar el nivel de folatos, puesto que otras enzimas actuarán a modo de cuello de botella. Prueba de ello fue que los experimentos dónde la expresión de los genes de las enzimas GTPCHI, ADCS, DHFS, HPPK/DHPS y FPGS (reacciones 1, 5, 9, 4 y 7, 10a de la **Figura 9**) se modificó individualmente, resultaron en un aumento nulo o insuficiente. Otros en los que se sobreexpresaban varios genes de forma simultánea tuvieron más éxito (Strobbe y Van Der Straeten, 2017). Los mejores resultados se obtuvieron al utilizar las enzimas GTPCHI y ADCS (reacciones 1 y 5 de la **Figura 9**), consiguiendo un arroz transgénico con un contenido en folatos 100 veces superior (Storozhenko *et al.*, 2007).

3.4. BIOFORTIFICACIÓN EN VITAMINA C

La VitC o ascorbato no es sintetizada por el ser humano, que requiere de su obtención mediante la ingesta de alimentos principalmente de origen vegetal.

La biofortificación de vitamina C se ha abordado en **patata** mediante la sobreexpresión del gen de la GDP-galactosa pirofosforilasa (*GGP* o *VTC2*) de *Arabidopsis* o de la propia patata, que es la primera enzima de la ruta de síntesis de la VitC. La patata transgénica triplicó los niveles de vitC, alcanzando los 0,45 mg/g ps, de forma que la ingesta de únicamente 200g de patata suministraría los 90 mg diarios recomendados (Bulley *et al.*, 2012). A pesar de que se ha probado la sobreexpresión de otras enzimas, ninguna ha tenido tanto éxito como ésta última.

3.5. BIOFORTIFICACIÓN EN HIERRO Y ZINC

Como se comentó en la introducción, la deficiencia de Fe es la más prevalente a nivel mundial, afectando a unos 2.000 millones de personas (World Health Organization, 2020). Tiene especial impacto en niños y embarazadas de África y Asia (Kumar *et al.*, 2019). El Fe es un elemento mineral esencial en las plantas que participa en mecanismos relevantes como la fotosíntesis, respiración e infinidad de rutas metabólicas (Ludwig y Slamet-Loedin, 2019).

El Zn es también esencial para el ser humano por lo que debe incorporarlo a través de la ingesta de alimentos sobre todo de origen vegetal. El Zn en las plantas actúa como cofactor de muchas enzimas y participa en procesos como la diferenciación y la proliferación celular. La asimilación de Fe y Zn en plantas está muy relacionada, de modo que los mecanismos y componentes que participan en la misma son muy similares (Sharma *et al.*, 2013).

El Fe se encuentra en la rizosfera en forma Fe^{3+} principalmente, que es poco soluble, pero también como Fe^{2+}, más soluble. Las plantas tienen 2 estrategias para absorberlo, tal como vemos en la **Figura 10a**. En el caso de las gramíneas como el arroz, siguen la estrategia II. Ésta consiste en la liberación al medio de fitosideróforos, pequeñas moléculas orgánicas con gran afinidad por el Fe^{3+}. Destaca el ácido deoximugineico (DMS), que es exportado a través del transportador TOM1. El consecuente quelato es importado por el transportador YSL15. Por otro lado, otros cultivos como la yuca efectúan la estrategia I, de forma que la oxidorreductasa FRO2 reduce el Fe^{3+}a Fe^{2+}, el cual es translocado al interior de las células de la raíz por el transportador IRT1. En cualquier caso, el Fe pasa a través del apoplasto hasta llegar a la endodermis y se transfiere al simplasto en forma de Fe^{2+}, donde crea un complejo con nicotinamina, un aminoácido quelante cuya síntesis depende de la enzima nicotinamina sintasa (NAS) y que a su vez es precursor del DMS. Una vez atraviesa la endodermis, el Fe alcanza el xilema, por el cual será translocado a otras partes de la planta en forma de Fe^{3+}-citrato (Connorton *et al.*, 2017). Finalmente, se almacena en cloroplastos, mitocondrias y sobretodo en vacuolas en formas no tóxicas (Wu *et al.*, 2019).

En el caso de la absorción de Zn, los mecanismos son muy semejantes e incluso comparten algunos de los componentes. Como puede verse en la **Figura 10b**, IRT1 incorpora el Zn^{2+} directamente desde la rizosfera a las células epidérmicas de la raíz, al igual que el Fe^{2+} (Bashir *et al.*, 2012). Los fitosideróforos liberados, como el DMS, también solubilizan el Zn (Sharma *et al.*, 2013), de forma que el compuesto quelado es absorbido por transportadores YSL, igual que con el Fe (Bashir *et al.*, 2012). Los complejos del Zn con DMS y nicotinamina tienen una gran relevancia en la translocación a lo largo de la planta (Bashir *et al.*, 2012; Nakandalage *et al.*, 2016). Como factor diferencial del Zn frente al Fe destaca la participación de las proteínas

de la familia ZIP. Algunas como ZIP1 y ZIP3 participan en la absorción de Zn^{2+} desde la rizosfera. Otras como ZIP4, ZIP5, y ZIP8 están implicados en el transporte desde la raíz a la parte aérea (Nakandalage *et al.*, 2016).

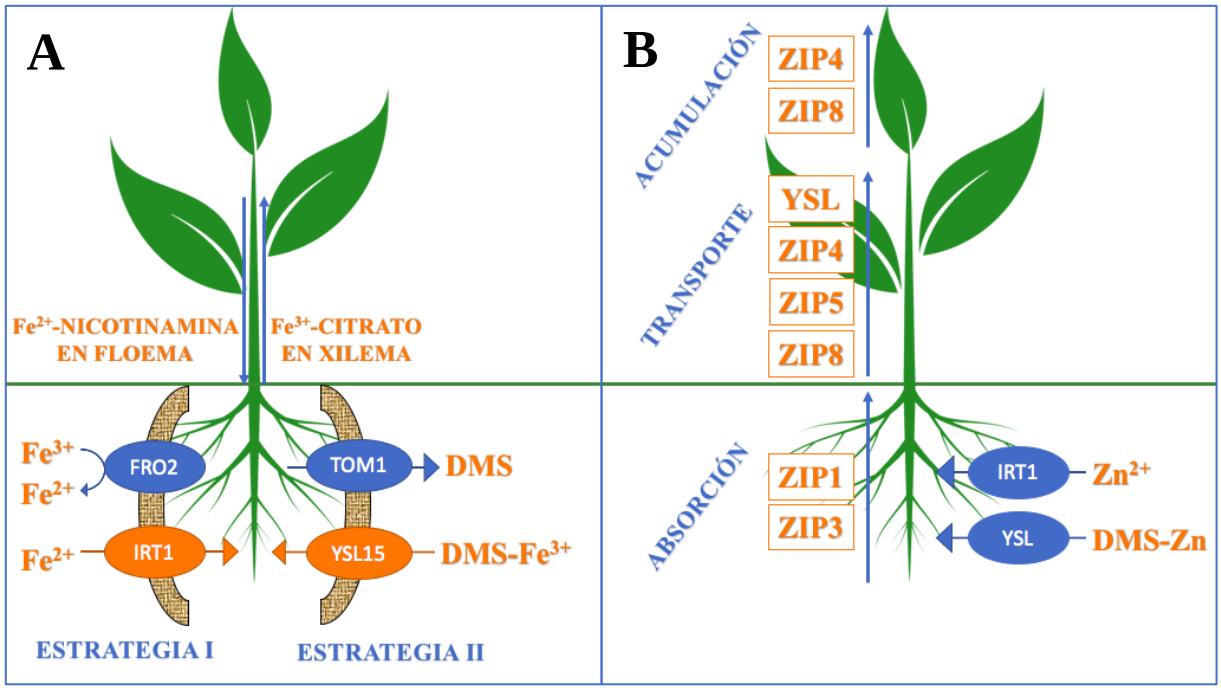

Figura 10. Representación de las estrategias existentes para la absorción y translocación de Fe (A) y Zn (B) desde la rizosfera al interior de la planta, así como para el transporte en la misma.

El **arroz** es uno de los cereales con menor concentración de Fe y Zn (Johnson *et al.*, 2011). Por ejemplo, su contenido en Zn gira en torno a 22 µg/g ps y solo proporciona un 20% del Zn recomendado diariamente, a pesar de que hay poblaciones que consumen cerca de 1 kg diario (Sharma *et al.*, 2013). Este cultivo incorpora el Fe siguiendo la estrategia II aunque en el caso del Zn tiene más importancia su absorción por la estrategia I (Bashir *et al.*, 2012; Connorton *et al.*, 2017).

El primer experimento de biofortificación en Fe del arroz data de 1999 y centró su atención en la ferritina, proteína capaz de acumular hasta 4.500 átomos de Fe. Los investigadores transformaron una variedad de arroz (*O. sativa* cv. Kita-ake) con el gen de la ferritina de soja (*SFER*) dirigido por un promotor específico de endospermo (*GluB-1*). Lograron triplicar los niveles de Fe (de 11,2 a 38,1 µg/g ps), lo cual supone que la ingesta de una porción de 150g (unos 5,7 mg de Fe) aportaría entre el 40% y el 70% del DRI (Goto *et al.*, 1999). A partir de este descubrimiento se desarrollaron experimentos similares cambiando el fondo genético y los promotores, pero sin obtener aumentos significativos en los niveles de Fe (Ludwig y Slamet-Loedin, 2019). Posteriormente, se realizaron experimentos en los que se sobreexpresaba el gen de la propia ferritina de arroz (*OsFER2*). En ellos se consiguieron duplicar los niveles de Fe en

el endospermo, lo cual es inferior respecto al uso de la ferritina de soja, pero tiene la ventaja de usarse un gen endógeno. También se detectó un leve aumento de Zn (Paul *et al.*, 2012).

Otros intentos se basaron en la sobreexpresión de los genes *NAS*, que participan tanto en la asimilación de Fe como de Zn. Se desarrollaron líneas transgénicas en las que se introdujeron genes de síntesis de fitosideróforos de cebada, como *HvNAS1* e *HvIDS3*. El arroz sólo sintetiza DMS, pero con el gen *HvIDS3* es capaz de sintetizar otros ácidos mugineicos y aumenta hasta 1,4 veces el contenido de Fe y 1,35 veces el de Zn (Masuda *et al.*, 2008). En otro estudio que consistió en sobreexpresar el gen *HvNAS1* de cebada en arroz, se incrementaron 15 veces los niveles de nicotinamina, 2,3 veces la concentración de Fe y 1,5 la de Zn (Masuda *et al.*, 2009). Por otro lado, al elegir el respectivo gen de *A. thaliana AtNAS1*, junto con la ferritina de *Phaseolus vulgaris PvFER* y la fitasa de *Aspergillus fumigates Afphytase*, se obtuvo un aumento de 6,3 veces la concentración de Fe, llegando a unos 7 μg/g ps y 1,5 veces la de Zn, consiguiendo más de 30 μg/g ps (Wirth *et al.*, 2009). Por último, existen trabajos más recientes que buscan sobreexpresar los genes propios del arroz. Algunos de ellos han logrado líneas de arroz transgénico con más copias del gen *OsNAS2*, en la que se han conseguido hasta 19 μg/g ps de Fe y 76 μg/g ps de Zn, y otros líneas con más copias de *OsNAS3* que han alcanzado los 10 μg/g ps y 49 μg/g ps respectivamente (Johnson *et al.*, 2011). Al igual que muchos otros experimentos, aquí se utilizan vectores binarios. Podemos ver como ejemplo la construcción del T-DNA utilizada en este último experimento (**Fig. 11**).

Figura 11. Esquema de la composición del T-DNA del vector binario utilizado para la transformación de genes *OsNAS* (Johnson *et al.*, 2011). RB, brazo derecho; 2x35S, promotor dual CaMV 35S; *OsNAS*, secuencia codificante de genes *OsNAS2* u *OsNAS3*; nos T, terminador; 35S, promotor CaMV 35S; *ntpII*, gen de resistencia a kanamicina; LB, brazo izquierdo.

Otro de los partícipes comunes de la asimilación de ambos metales es el transportador IRT1. Su sobreexpresión ha conseguido un aumento de 1,2 veces de concentración de Zn y Fe en las semillas maduras de la variedad Japonica cv. Dongjin de arroz (Lee y An, 2009).

Hasta ahora sólo se ha utilizado 1 gen que forma parte de la respuesta de la planta en una situación de déficit de Fe, el gen *OsIRO2*. Induciendo una expresión constitutiva de dicho gen se duplicó la concentración de Fe en el arroz sin procesar (Ogo *et al.*, 2011).

Por último, recientemente se han obtenido buenos resultados en experimentos en los que el arroz se transforma de forma simultánea con múltiples genes. Uno de ellos, publicado en 2019,

se fundamenta en la introducción de 3 genes: *AtNRAMP3*, *AtNAS1* y *PvFER*. Se corresponden con un transportador de la membrana vacuolar que participa en almacenamiento, un gen de síntesis de nicotinamina para la absorción y un gen de síntesis de ferritina respectivamente. El resultado fue la consecución de granos de arroz con 13,65 µg/g ps de Fe, 5 veces más que el control, y aumento en Zn de hasta 48,18 µg/g ps, más del doble que en la variedad no modificada (Wu *et al.*, 2019). Años antes, la coexpresión de los genes *SFER-H1* (ferritina de soja) y *OsNAS2* tuvo como resultado una concentración de hasta 15 µg/g ps de Fe y 45,7 µg/g ps de Zn en ensayos de campo (Trijatmiko *et al.*, 2016). En la **tabla 3** se resumen los experimentos desarrollados en este apartado y en la **tabla 4** se exponen otros resultados exitosos para el aumento de Fe.

Tabla 3. Aumento aproximado del contenido en Fe y Zn en variedades transgénicas de arroz biofortificadas.

Genes	(aumento)		Variedad	Referencia
	Fe	Zn		
SFER	x3	-	Japonica cv. Kita-ake	(Goto *et al.*, 1999)
OsFER2	x2	x1,3	Indica cv. Pusa-Sugandh II	(Paul *et al.*, 2012)
HvNAS1+HvIDS3	x1,4	x1,4	Japonica cv. Tsukinohikari	(Masuda *et al.*, 2008)
HvNAS1	x2,3	x1,5	Japonica cv. Tsukinohikari	(Masuda *et al.*, 2009)
AtNAS1+PvFER+Afphytasa	x6,3	x1,5	Japonica cv. Taipei 309	(Wirth *et al.*, 2009)
OsNAS2	x4	x2	Japonica cv. Nipponbare	(Johnson *et al.*, 2011)
OsNAS3	x2	x1,5	Japonica cv. Nipponbare	(Johnson *et al.*, 2011)
OsIRT1	x1,2	x1,2	Japonica cv. Dongjin	(Lee y An, 2009)
OsIRO2	x2	-	Japonica cv. Tsukinohikari	(Ogo *et al.*, 2011)
AtNRAMP3+AtNAS1+PvFER	x5	x2	Indica cv. IR64	(Wu *et al.*, 2019)
SFER-H1+OsNAS2	x6	x1,5	Indica cv. IR64	(Trijatmiko *et al.*, 2016)

Tabla 4. Contenido aproximado de Fe en variedades transgénicas de arroz biofortificadas. Modificado de Ludwig y Slamet-Loedin (2019). TG, línea transgénica; WT, línea *wild-type*.

Genes	[Fe](µg/g ps)		Variedad	Referencia
	TG	WT		
TOM1	18	15	Japonica cv. Tsukinohikari	(Nozoye *et al.*, 2011)
OsNAS1	19	12	Japonica cv. Xiushui 110	(Zheng *et al.*, 2010)
OsNAS2	12	4	Japonica cv. Dongjin	(Lee *et al.*, 2012)
OsNAS3	10	4	*O. sativa* L. cv. EYI 105	(Lee *et al.*, 2009)
OsYSL2	7,5	1,8	Japonica cv. Tsukinohikari	(Ishimaru *et al.*, 2010)
OsNAS1	40	20	*O. sativa* L. cv. EYI 105	(Díaz-Benito *et al.*, 2018)
SFERH1	9,2	3,8	Indica cv. BR29	(Khalekuzzaman *et al.*, 2006)

En el caso de otros cultivos como la **patata dulce**, para la mejora de los niveles de metales como Fe y Zn se han creado líneas transgénicas con el gen *HvNAS1* de soja, como ya se hiciera en arroz. El objetivo principal era mejorar el contenido en Fe en las plantas, que tenían deficiencias por vivir en suelos pobres. Se logró incrementar la concentración de Fe y Zn en las hojas y también en las raíces, dónde se duplicaron los niveles de Fe (15,1 μg/g pf) y se triplicaron los de Zn (3,5 μg/g en pf)(Nozoye *et al.*, 2017).

Finalmente en **yuca,** el programa BC+ también se ha centrado en incrementar los niveles de Fe y Zn. Mediante la expresión de una proteína específica de asimilación de Fe, FEA1 de *Chlamydomonas reinhardtii*, se aumentó la concentración de Fe en la raíz hasta 42 μg/g pf tanto en ensayos de laboratorio como de campo. La concentración era incluso mayor en estadíos más jóvenes de la raíz, pero se cree que disminuía por el proceso de tuberización y la pérdida de pelos radicales (Ihemere, 2012). Más recientemente, otros experimentos han obtenido resultados muy favorables. La sobreexpresión del gen *VIT1* de *A. thaliana*, un transportador vacuolar de Fe, resultó en la cuatriplicación de sus niveles (Narayanan *et al.*, 2015). Unos años después, el mismo grupo ha conseguido aumentar la concentración de Fe entre 7 y 18 veces gracias a la coexpresión de los genes *IRT1* y *FER1* de *A. thaliana.* De hecho, dichos resultados se han obtenido no sólo en laboratorio, sino que además se mantuvieron en los sucesivos ensayos de campo (Narayanan *et al.*, 2019).

El mismo programa BC+, con el objetivo de aumentar la concentración de Zn en yuca, se ha centrado en la sobreexpresión de genes que codifican transportadores vacuolares y de membrana. En el segundo caso se logró aumentar hasta 10 veces el contenido en Zn en la raíz, pero las hojas mostraron deficiencias del mismo (Sayre *et al.*, 2011). La sobreexpresión de otros 2 transportadores, AtZIP1 y AtMTP1, resultó en niveles de Zn todavía más altos, aunque de nuevo se generaron fenotipos aberrantes debido a la deficiencia de Zn en las hojas. Sin embargo, la coexpresión de los genes *IRT1* y *FER1* de *A. thaliana*, experimento mencionado en el párrafo anterior, consiguió aumentos de hasta 10 veces en los niveles de Zn y sin ningún efecto sobre el resto de la planta (Narayanan *et al.*, 2019).

3.6. ANTINUTRIENTES

El fitato se considera un antinutriente, aunque algunos trabajos apuntan que su consumo es efectivo para la protección frente a diferentes tipos de cáncer. Es el antinutriente más abundante en cereales. De hecho, el 80% del P de la semilla está en forma de fitato. Se une al Fe y al Zn dificultando su absorción en el intestino (Nakandalage *et al.*, 2016).

Para reducir el contenido en fitato en alimentos de origen vegetal, generalmente lo que se busca es obstaculizar su ruta biosintética (**Fig. 12**).

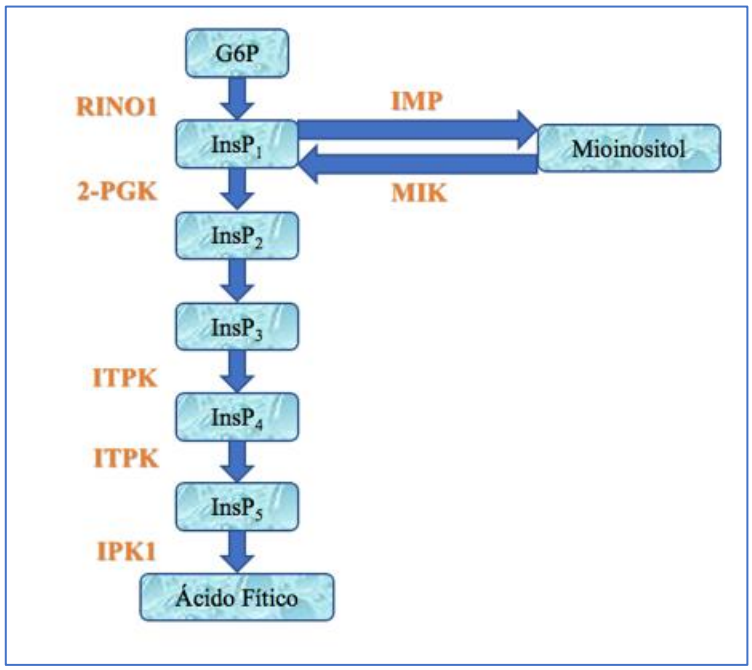

Figura 12. Ruta metabólica esquemática de síntesis de ácido fítico dependiente de lípidos en arroz. G6P, Glucosa-6-fosfato; $InsP_1$, inositol monofosfato; $InsP_2$, inositol bifosfato; $InsP_3$, inositol trifosfato; $InsP_4$, inositol tetrafosfato; $InsP_5$, inositol pentakisfosfato; RINO1, $InsP_1$ sintasa; 2-fosfoglicerato kinasa; IPTK, inositol 1,3,4-trifosfato 5/6-kinasa; IPK1, 1,3,4,5,6-pentakisfosfato 2-kinasa; IMP, inositol monofosfatasa; MIK, myo-inositol kinasa.

Para ello se han desarrollado plantas transgénicas con el cDNA antisentido de distintas enzimas de dicha ruta, de manera que se bloquea su síntesis. Estos genes están controlados por un promotor específico de la semilla para evitar efectos negativos en la propia planta. Al utilizar el cDNA antisentido del gen de la primera enzima de la ruta, la 1D-myo-inositol 3-fosfato sintasa (*RINO1*) bajo el control del promotor *GluB-1* la reducción fue del 16% (Kuwano *et al.*, 2006). Estos resultados no fueron demasiado buenos debido a las diferencias espaciales y temporales en los patrones de expresión del promotor y de *RINO1*. Al cambiar el promotor a *Ole18* se redujo el ácido fítico en un 68% (Kuwano *et al.*, 2009). Por el contrario, el bloqueo del gen de la última enzima de la ruta (*IPK1*) permitió crear variedades transgénicas con una reducción del 69% de ácido fítico en la semilla (de 10,28 a 3,16 mg/g ps). (Ali *et al.*, 2013). Más recientemente, las investigaciones se están centrando en estudiar fenotipos con bajo contenido en ácido fítico originados por mutaciones naturales en genes de algunas enzimas de la ruta. Algunos de ellos son *lpa*, *lpa2* o *lpa3* (Kishor *et al.*, 2019).

Otro estudio se focaliza en la reducción del fitato mediante la mutación del gen *OsIPTK6* que codifica para la enzima IPTK, intermediaria en la ruta biosintética (**Fig. 12**). Se crearon 4 líneas mutantes alterando el primer exón de diferentes maneras mediante CRISPR/Cas9. 2 de ellas, caracterizadas por una deleción de 6 nucleótidos *in frame* y la inserción de 1 nucleótido respectivamente, redujeron el contenido en ácido fítico en 10,1% y 32,1%. Sin embargo, la segunda modificación conllevó otros efectos negativos, como el acortamiento de las panículas y de la planta, a la par que un alto porcentaje de granos vacíos. Mientras tanto, la primera línea no tenía estos efectos, pero sí una menor tolerancia al estrés (Jiang *et al.*, 2019).

4. REGULACIÓN

Actualmente, la Unión Europea y otros 43 países han aprobado el consumo y/o cultivo de hasta 40 variedades transgénicas en las que se han implementado 41 rasgos. Sin embargo, únicamente se cultivan 12 de estas variedades modificados genéticamente, y el 99% del volumen total de cultivo corresponde a soja, maíz, algodón y colza con resistencias a herbicidas e insectos, de modo que la mayoría de cultivos transgénicos aprobados están muy limitados (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, 2020). Este hecho es especialmente relevante en la Unión Europea, donde la Comisión Europea ha aprobado únicamente 2 cultivos, de los cuales sólo 1 se mantiene, el maíz Bt (MON810). Esto se debe a los estrictos trámites legales y requerimientos que deben conseguirse, lo cual ha llevado a que las compañías biotecnológicas desistan en sus intentos por desarrollar cultivos en Europa (Halford, 2019). La dura legislación es consecuencia de una rígida interpretación del principio de precaución, mientras que otros países se muestran más laxos en ese sentido al no tener evidencias de ningún tipo de peligro. De hecho, no sólo existen trabas para la producción y/o comercialización, sino que también resulta complicada la importación de este tipo de cultivos o de sus productos a la Unión Europea (Smyth, 2017).

La aparición de nuevas técnicas de edición genética como CRISPR supone una esperanza para la biotecnología, puesto que se equiparan a mutaciones espontáneas de índole natural, de forma que en varios países como Estados Unidos no se ven afectadas por las mismas regulaciones que los organismos transgénicos, lo que facilita los trámites legales para su producción y comercialización (Smyth, 2017). Sin embargo, en 2018 en Europa se decidió que estos cultivos editados genéticamente deberán estar bajo la misma regulación que cualquier otro transgénico, lo que supone que va a ser muy difícil que estos avances se hagan realidad en este continente (Holman, 2019).

5. CONCLUSIÓN

Una vez transcurridos más de 20 años de la aparición de los primeros cultivos transgénicos y tras cientos de estudios exitosos centrados en el área de los cultivos biofortificados, parece claro que toda inversión es poca, más aún sabiendo el tremendo impacto que pueden tener en los millones de personas que a día de hoy padecen o padecerán problemas de salud como consecuencia de la deficiencia de micronutrientes. Una vez hallada la clave para solucionar tan grave problema, podría parecer que sólo queda lo más fácil, que es suministrársela a la población. Sin embargo, esto no es así y para que se haga realidad a escala global debe desaparecer el miedo a los transgénicos que ha llevado a la creación de leyes muy estrictas, las cuales frenan su desarrollo, y al rechazo de tantas personas. Una vez superadas estas barreras sólo queda seguir impulsando la investigación y la ciencia en general, pues ningún esfuerzo es comparable al beneficio que es capaz de devolver a la sociedad.

6. REFERENCIAS

Ali, N., Paul, S., Gayen, D., Sarkar, S. N., Datta, K. y Datta, S. K. (2013) "Development of low phytate rice by RNAi mediated seed-specific silencing of inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase gene (IPK1)", *PLOS ONE*, 8(7), e68161.

Altpeter, F., Springer, N. M., Bartley, L. E., Blechl, A., Brutnell, T. P., Citovsky, V., Conrad, L., Gelvin, S. B., Jackson, D., Kausch, A. P., Lemaux, P. G., Medford, J. I., Orozo-Cardenas, M., Tricoli, D., VanEck, J., Voytas, D. F., Walbot, V., Wang, K., Zhang, Z. J. y Stewart, C. N. (2016) "Advancing crop transformation in the era of genome editing", *The plant cell*, 28, pp. 1510-1520.

Bai, C., Capell, T., Berman, J., Medina, V., Sandmann, G., Christou, P. y Zhu, C. (2016) "Bottlenecks in carotenoid biosynthesis and accumulation in rice endosperm are influenced by the precursor-product balance", *Plant biotechnology journal*, 14(1), pp. 195-205.

Bailey, R. L., West Jr., K. P. y Black, R. E. (2015) "The epidemiology of global micronutrient deficiencies", *Annals of nutrition and metabolism*, 66(2), pp. 22-33.

Barampuram, S. y Zhang, Z. J. (2011) "Recent advances in plant transformation", en Birchler, J. A. (ed.) *Methods in molecular biology*. Columbia: Springer Science+Business Media, pp. 1-35.

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), pp. 1709-1712.

Bashir, K., Ishimaru, Y. y Nishizawa, N. K. (2012) "Molecular mechanisms of zinc uptake and translocation in rice", *Plant and soil*, 361(1-2), pp. 189-201.

Blancquaert, D., Storozhenko, S., Van Daele, J., Stove, C., Visser, R. G. F., Lambert, W. y Van Der Straeten, D. (2013) "Enhancing pterin and para-aminobenzoate content is not sufficient to successfully biofortify potato tubers and *Arabidopsis thaliana* plants with folate", *Journal of experimental botany*, 64(12), pp. 3899-3909.

Bouis, H. E. (2002) "Plant breeding: a new tool for fighting micronutrient malnutrition", *The journal of nutrition*, 132(3), pp. 491S-494S.

Bulley, S., Wright, M., Rommens, C., Yan, H., Rassam, M., Lin-Wang, K., Andre, C., Brewster, D., Karunairetnam, S., Allan, A. C. y Laing, W. A. (2012) "Enhancing ascorbate in fruits and tubers through over-expression of the l-galactose pathway gene GDP-l-galactose phosphorylase", *Plant biotechnology journal*, 10(4), pp. 390-397.

Burlingame, B., Mouillé, B. y Charrondière, R. (2009) "Nutrients, bioactive non-nutrients and anti-nutrients in potatoes", *Journal of food composition and analysis*, 22(6), pp. 494-502.

Connorton, J. M., Balk, J. y Rodríguez-Celma, J. (2017) "Iron homeostasis in plants – a brief overview",

Metallomics, 9(7), pp. 813-823.

Das, A., Thakur, S., Soren, K. R., Datta, S. y Singh, N. P. (2016) "Transgenic strategies towards nutritional enrichment of crops", en Singh, U., Praharaj, C., Singh, S., y Singh, N. (eds.) *Biofortification of food crops*. New Delhi: Springer, pp. 105-113.

Datta, K., Mayank, R., Parkhi, V., Oliva, N., Tan, J. y Datta, S. K. (2006) "Improved «golden» indica rice and post-transgeneration enhancement of metabolic target products of carotenoids (β-carotene) in transgenic elite cultivars (IR64 and BR29)", *Current science*, 91(7), pp. 935-939.

Díaz-Benito, P., Banakar, R., Rodríguez-Menéndez, S., Capell, T., Pereiro, R., Christou, P., Abadía, J., Fernández, B. y Álvarez-Fernández, A. (2018) "Iron and zinc in the embryo and endosperm of rice (*Oryza sativa* L.) seeds in contrasting 2′-deoxymugineic acid/nicotianamine scenarios", *Frontiers in plant science*, 9(1190), pp. 1-17.

Diretto, G., Tavazza, R., Welsch, R., Pizzichini, D., Mourgues, F., Papacchioli, V., Beyer, P. y Giuliano, G. (2006) "Metabolic engineering of potato tuber carotenoids through tuber-specific silencing of lycopene epsilon cyclase", *BMC plant biology*, 6, p. 13.

Ducreux, L. J. M., Morris, W. L., Hedley, P. E., Shepherd, T., Davies, H. V, Millam, S. y Taylor, M. A. (2005) "Metabolic engineering of high carotenoid potato tubers containing enhanced levels of β-carotene and lutein", *Journal of experimental botany*, 56(409), pp. 81-89.

Van Eck, J., Conlin, B., Garvin, D. F., Mason, H., Navarre, D. A. y Brown, C. R. (2007) "Enhancing beta-carotene content in potato by RNAi-mediated silencing of the beta-carotene hydroxylase gene", *American journal of potato research*, 84(4), pp. 331-342.

EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (2012) "Scientific opinion on the re-evaluation of mixed carotenes (E 160a (i)) and beta-carotene (E 160a (ii)) as a food additive", *EFSA journal*, 10(3), p. 2593.

Endo, A., Saika, H., Takemura, M., Misawa, N. y Toki, S. (2019) "A novel approach to carotenoid accumulation in rice callus by mimicking the cauliflower *Orange* mutation via genome editing", *Rice*, 12(1), p. 81.

Food and Agriculture Organization of the United Nations, International Fund for Agricultural Development, United Nations Children's Fund y World Health Organization (2019) *The state of food security and nutrition in the world 2019. Safeguarding against economic slowdowns and downturns*. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Garg, M., Sharma, N., Sharma, S., Kapoor, P., Kumar, A., Chunduri, V. y Arora, P. (2018) "Biofortified crops generated by breeding, agronomy, and transgenic approaches are improving lives of millions of people around the world", *Frontiers in nutrition*, 5(12), pp. 1-33.

Gorelova, V., Ambach, L., Rébeillé, F., Stove, C. y Van Der Straeten, D. (2017) "Folates in plants: research advances and progress in crop biofortification", *Frontiers in chemistry*, 5(21), pp. 1-20.

Goto, F., Yoshihara, T., Shigemoto, N., Toki, S. y Takaiwa, F. (1999) "Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene", *Nature biotechnology*, 17(3), pp. 282-286.

Granados Díaz, C. y Chaparro-Giraldo, A. (2012) "Métodos de transformación genética de plantas", *Revista U.D.C.A actualidad & divulgación científica*, 15(1), pp. 49-61.

Halford, N. G. (2019) "Legislation governing genetically modified and genome-edited crops in Europe: the need for change", *Journal of the science of food and agriculture*, 99(1), pp. 8-12.

Hameed, A., Zaidi, S. S., Shakir, S. y Mansoor, S. (2018) "Applications of new breeding technologies for potato improvement", *Frontiers in plant science*, 9(925), pp. 1-15.

Hefferon, K. (2019) "Biotechnological approaches for generating zinc-enriched crops to combat malnutrition", *Nutrients*, 11(2), p. 253.

Holman, C. M. (2019) "A fractured international response to CRISPR-enabled gene editing of agricultural products", *Biotechnology law report*, 38(1), pp. 3-23.

Ihemere, U. (2012) "Iron biofortification and homeostasis in transgenic cassava roots expressing the algal iron assimilatory gene, *FEA1*", *Frontiers in plant science*, 3(171), pp. 1-22.

International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (2020) *GM approval database*. Disponible en: http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/ (Accedido: 4 de febrero de 2020).

Ishimaru, Y., Masuda, H., Bashir, K., Inoue, H., Tsukamoto, T., Takahashi, M., Nakanishi, H., Aoki, N., Hirose, T., Ohsugi, R. y Nishizawa, N. K. (2010) "Rice metal-nicotianamine transporter, OsYSL2, is required for the long-distance transport of iron and manganese", *The plant journal*, 62(3), pp. 379-390.

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), pp. 5429-5433.

Jena, J., Sethy, P., Jena, T., Ranjan Misra, S., Kumar Sahoo, S., Kumar Dash, G., Jagadish Jena, C. y Palai, J. (2018) "Rice biofortification: a brief review", *Journal of pharmacognosy and phytochemistry*, 7(1), pp. 2644-2647.

Ji, Q., Xu, X. y Wang, K. (2013) "Genetic transformation of major cereal crops", *The international journal of developmental biology*, 57(6-7-8), pp. 495-508.

Jiang, M., Liu, Yang, Liu, Yanhua, Tan, Y., Huang, J. y Shu, Q. (2019) "Mutation of inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase6 impairs plant growth and phytic acid synthesis in rice", *Plants*, 8(5), p. 114.

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A. y Charpentier, E. (2012) "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity", *Science*, 337(6096), pp. 816-821.

Johnson, A. A. T., Kyriacou, B., Callahan, D. L., Carruthers, L., Stangoulis, J., Lombi, E. y Tester, M. (2011) "Constitutive overexpression of the *OsNAS* gene family reveals single-gene strategies for effective iron- and zinc-biofortification of rice endosperm", *PLOS ONE*, 6(9), e24476.

Kang, C., Zhai, H., Xue, L., Zhao, N., He, S. y Liu, Q. (2018) "A lycopene β-cyclase gene, *IbLCYB2*, enhances carotenoid contents and abiotic stress tolerance in transgenic sweetpotato", *Plant Science*, 272, pp. 243-254.

Ke, Q., Kang, L., Kim, H. S., Xie, T., Liu, C., Ji, C. Y., Kim, S. H., Park, W. S., Ahn, M.-J., Wang, S., Li, H., Deng, X. y Kwak, S.-S. (2019) "Down-regulation of lycopene ε-cyclase expression in transgenic sweetpotato plants increases the carotenoid content and tolerance to abiotic stress", *Plant science*, 281, pp. 52-60.

Khalekuzzaman, M., Datta, K., Oliva, N., Alam, M. F., Joarder, O. I. y Datta, S. K. (2006) "Stable integration, expression and inheritance of the ferritin gene in transgenic elite indica rice cultivar BR29 with enhanced iron level in the endosperm", *Indian journal of biotechnology*, 5(1), pp. 26-31.

Kim, S.-E., Kim, H. S., Wang, Z., Ke, Q., Lee, C.-J., Park, S.-U., Lim, Y.-H., Park, W. S., Ahn, M.-J. y Kwak, S.-S. (2019) "A single amino acid change at position 96 (Arg to His) of the sweetpotato Orange protein leads to carotenoid overaccumulation", *Plant cell reports*, 38(11), pp. 1393-1402.

Kim, S. H., Ahn, Y. O., Ahn, M.-J., Lee, H.-S. y Kwak, S.-S. (2012) "Down-regulation of β-carotene hydroxylase increases β-carotene and total carotenoids enhancing salt stress tolerance in transgenic cultured cells of sweetpotato", *Phytochemistry*, 74, pp. 69-78.

Kim, S. H., Jeong, J. C., Park, S., Bae, J.-Y., Ahn, M.-J., Lee, H.-S. y Kwak, S.-S. (2014) "Down-regulation of sweetpotato lycopene β-cyclase gene enhances tolerance to abiotic stress in transgenic calli", *Molecular biology reports*, 41(12), pp. 8137-8148.

Kim, S. H., Kim, Y.-H., Ahn, Y. O., Ahn, M.-J., Jeong, J. C., Lee, H.-S. y Kwak, S.-S. (2013) "Downregulation of the lycopene ϵ-cyclase gene increases carotenoid synthesis via the β-branch-specific pathway and enhances salt-stress tolerance in sweetpotato transgenic calli", *Physiologia plantarum*, 147(4), pp. 432-442.

Kishor, D. S., Lee, C., Lee, D., Venkatesh, J., Seo, J., Chin, J. H., Jin, Z., Hong, S.-K., Ham, J.-K. y Koh, H. J. (2019) "Novel allelic variant of *Lpa1* gene associated with a significant reduction in seed phytic acid content in rice (*Oryza sativa* L.)", *PLOS ONE*, 14(3), e0209636.

Kumar, S., Palve, A., Joshi, C., Srivastava, R. K. y Rukhsar (2019) "Crop biofortification for iron (Fe), zinc (Zn) and vitamin A with transgenic approaches", *Heliyon*, 5(6), e01914.

Kuwano, M., Mimura, T., Takaiwa, F. y Yoshida, K. T. (2009) "Generation of stable 'low phytic acid' transgenic rice through antisense repression of the 1d- myo -inositol 3-phosphate synthase gene (*RINO1*) using the 18-kDa oleosin promoter", *Plant biotechnology journal*, 7(1), pp. 96-105.

Kuwano, M., Ohyama, A., Tanaka, Y., Mimura, T., Takaiwa, F. y Yoshida, K. T. (2006) "Molecular breeding for transgenic rice with low-phytic-acid phenotype through manipulating myo-inositol 3-phosphate synthase gene", *Molecular breeding*, 18(3), pp. 263-272.

Laurie, S., Faber, M., Adebola, P. y Belete, A. (2015) "Biofortification of sweet potato for food and nutrition security in South Africa", *Food research international*, 76(4), pp. 962-970.

Lee, S. y An, G. (2009) "Over-expression of *OsIRT1* leads to increased iron and zinc accumulations in rice", *Plant, cell & environment*, 32(4), pp. 408-416.

Lee, S., Jeon, U. S., Lee, S. J., Kim, Y.-K., Persson, D. P., Husted, S., Schjorring, J. K., Kakei, Y., Masuda, H., Nishizawa, N. K. y An, G. (2009) "Iron fortification of rice seeds through activation of the nicotianamine synthase

gene", *Proceedings of the national academy of sciences*, 106(51), pp. 22014-22019.

Lee, S., Kim, Y.-S., Jeon, U. S., Kim, Y.-K., Schjoerring, J. K. y An, G. (2012) "Activation of rice nicotianamine synthase 2 (*OsNAS2*) enhances iron availability for biofortification", *Molecules and cells*, 33(3), pp. 269-275.

De Lepeleire, J., Strobbe, S., Verstraete, J., Blancquaert, D., Ambach, L., Visser, R. G. F., Stove, C. y Van Der Straeten, D. (2018) "Folate biofortification of potato by tuber-specific expression of four folate biosynthesis genes", *Molecular plant*, 11(1), pp. 175-188.

Li, L., Yang, Y., Xu, Q., Owsiany, K., Welsch, R., Chitchumroonchokchai, C., Lu, S., Eck, J. Van, Deng, X.-X., Failla, M. y Thannhauser, T. W. (2012) "The *Or* gene enhances carotenoid accumulation and stability during post-harvest storage of potato tubers", *Molecular plant*, 5(2), pp. 339-352.

Li, R., Kang, C., Song, X., Yu, L., Liu, D., He, S., Zhai, H. y Liu, Q. (2017) "A ζ-carotene desaturase gene, *IbZDS*, increases β-carotene and lutein contents and enhances salt tolerance in transgenic sweetpotato", *Plant science*, 262, pp. 39-51.

Liu, X., Wu, S., Xu, J., Sui, C. y Wei, J. (2017) "Application of CRISPR/Cas9 in plant biology", *Acta pharmaceutica sinica B*, 7(3), pp. 292-302.

Lopez, A. B., Van Eck, J., Conlin, B. J., Paolillo, D. J., O'Neill, J. y Li, L. (2008) "Effect of the cauliflower *or* transgene on carotenoid accumulation and chromoplast formation in transgenic potato tubers", *Journal of experimental botany*, 59(2), pp. 213-223.

Low, L.-Y., Yang, S.-K., Kok, D.-X. A., Ong-Abdullah, J., Tan, N.-P. y Lai, K.-S. (2018) "Transgenic plants: gene constructs, vector and transformation method", en Çelik, Ö. (ed.) *New visions in plant science*. Londres: IntechOpen, pp. 42-61.

Ludwig, Y. y Slamet-Loedin, I. H. (2019) "Genetic biofortification to enrich rice and wheat grain iron: from genes to product", *Frontiers in plant science*, 10(833), pp. 1-10.

Majumder, S., Datta, K. y Datta, S. K. (2019) "Rice biofortification: high iron, zinc, and vitamin-A to fight against «hidden hunger»", *Agronomy*, 9(12), p. 803.

Masuda, H., Suzuki, M., Morikawa, K. C., Kobayashi, T., Nakanishi, H., Takahashi, M., Saigusa, M., Mori, S. y Nishizawa, N. K. (2008) "Increase in iron and zinc concentrations in rice grains via the introduction of barley genes involved in phytosiderophore synthesis", *Rice*, 1(1), pp. 100-108.

Masuda, H., Usuda, K., Kobayashi, T., Ishimaru, Y., Kakei, Y., Takahashi, M., Higuchi, K., Nakanishi, H., Mori, S. y Nishizawa, N. K. (2009) "Overexpression of the barley nicotianamine synthase gene *HvNAS1* increases iron and zinc concentrations in rice grains", *Rice*, 2(4), pp. 155-166.

Mishra, R., Joshi, R. K. y Zhao, K. (2018) "Genome editing in rice: recent advances, challenges, and future implications", *Frontiers in plant science*, 9(1361), pp. 1-12.

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), pp. 174-182.

Nakandalage, N., Nicolas, M., Norton, R. M., Hirotsu, N., Milham, P. J. y Seneweera, S. (2016) "Improving rice zinc biofortification success rates through genetic and crop management approaches in a changing environment", *Frontiers in plant science*, 7(764), pp. 1-13.

Narayanan, N., Beyene, G., Chauhan, R. D., Gaitán-Solís, E., Gehan, J., Butts, P., Siritunga, D., Okwuonu, I., Woll, A., Jiménez-Aguilar, D. M., Boy, E., Grusak, M. A., Anderson, P. y Taylor, N. J. (2019) "Biofortification of field-grown cassava by engineering expression of an iron transporter and ferritin", *Nature biotechnology*, 37, pp. 144-151.

Narayanan, N., Beyene, G., Chauhan, R. D., Gaitán-Solis, E., Grusak, M. A., Taylor, N. y Anderson, P. (2015) "Overexpression of *Arabidopsis VIT1* increases accumulation of iron in cassava roots and stems", *Plant science*, 240, pp. 170-181.

National Institutes of Health (2020) *Nutrient recommendations : dietary reference intakes (DRI)*. Disponible en: https://ods.od.nih.gov/Health_Information/Dietary_Reference_Intakes.aspx (Accedido: 10 de febrero de 2020).

Nozoye, T., Nagasaka, S., Kobayashi, T., Takahashi, M., Sato, Yuki, Sato, Yoko, Uozumi, N., Nakanishi, H. y Nishizawa, N. K. (2011) "Phytosiderophore efflux transporters are crucial for iron acquisition in graminaceous plants", *Journal of biological chemistry*, 286(7), pp. 5446-5454.

Nozoye, T., Otani, M., Senoura, T., Nakanishi, H. y Nishizawa, N. K. (2017) "Overexpression of barley nicotianamine synthase 1 confers tolerance in the sweet potato to iron deficiency in calcareous soil", *Plant and*

soil, 418(1-2), pp. 75-88.

Ogo, Y., Itai, R. N., Kobayashi, T., Aung, M. S., Nakanishi, H. y Nishizawa, N. K. (2011) "*OsIRO2* is responsible for iron utilization in rice and improves growth and yield in calcareous soil", *Plant molecular biology*, 75(6), pp. 593-605.

Paine, J. A., Shipton, C. A., Chaggar, S., Howells, R. M., Kennedy, M. J., Vernon, G., Wright, S. Y., Hinchliffe, E., Adams, J. L., Silverstone, A. L. y Drake, R. (2005) "Improving the nutritional value of golden rice through increased pro-vitamin A content", *Nature biotechnology*, 23(4), pp. 482-487.

Paul, S., Ali, N., Gayen, D., Datta, S. K. y Datta, K. (2012) "Molecular breeding of *Osfer2* gene to increase iron nutrition in rice grain", *GM crops & food*, 3(4), pp. 310-316.

Sayre, R., Beeching, J. R., Cahoon, E. B., Egesi, C., Fauquet, C., Fellman, J., Fregene, M., Gruissem, W., Mallowa, S., Manary, M., Maziya-Dixon, B., Mbanaso, A., Schachtman, D. P., Siritunga, D., Taylor, N., Vanderschuren, H. y Zhang, P. (2011) "The BioCassava Plus Program: biofortification of cassava for sub-saharan Africa", *Annual review of plant biology*, 62(1), pp. 251-272.

Schaub, P., Al-Babili, S., Drake, R. y Beyer, P. (2005) "Why is golden rice golden (yellow) instead of red?", *Plant Physiology*, 138(1), pp. 441-450.

Sharma, A., Patni, B., Shankhdhar, D. y Shankhdhar, S. C. (2013) "Zinc – an indispensable micronutrient", *Physiology and molecular biology of plants*, 19(1), pp. 11-20.

Simkin, A. J. (2019) "Genetic engineering for global food security: photosynthesis and biofortification", *Plants*, 8(12), p. 586.

Smyth, S. J. (2017) "Genetically modified crops, regulatory delays, and international trade", *Food and energy security*, 6(2), pp. 78-86.

Song, X., Zhu, W., Tang, R., Cai, J., Chen, M. y Yang, Q. (2016) "Over-expression of *StLCYb* increases β-carotene accumulation in potato tubers", *Plant biotechnology reports*, 10(2), pp. 95-104.

De Steur, H., Mehta, S., Gellynck, X. y Finkelstein, J. L. (2017) "GM biofortified crops: potential effects on targeting the micronutrient intake gap in human populations", *Current opinion in biotechnology*, 44, pp. 181-188.

Stokstad, E. (2019) "After 20 years, golden rice nears approval", *Science*, 366(6468), p. 934.

Storozhenko, S., De Brouwer, V., Volckaert, M., Navarrete, O., Blancquaert, D., Zhang, G.-F., Lambert, W. y Van Der Straeten, D. (2007) "Folate fortification of rice by metabolic engineering", *Nature biotechnology*, 25(11), pp. 1277-1279.

Strobbe, S., De Lepeleire, J. y Van Der Straeten, D. (2018) "From in planta function to vitamin-rich food crops: the ACE of biofortification", *Frontiers in plant science*, 9(1862), pp. 1-27.

Strobbe, S. y Van Der Straeten, D. (2017) "Folate biofortification in food crops", *Current opinion in biotechnology*, 44, pp. 202-211.

Sun, T., Tadmor, Y. y Li, L. (2020) "Pathways for carotenoid biosynthesis, degradation, and storage", en Rodríguez-Concepción, M. y Welsch, R. (eds.) *Methods in molecular biology*. Nueva York: Springer Science+Business Media, pp. 3-23.

Swamy, B. P. M., Samia, M., Boncodin, R., Marundan, S., Rebong, D. B., Ordonio, R. L., Miranda, R. T., Rebong, A. T. O., Alibuyog, A. Y., Adeva, C. C., Reinke, R. y MacKenzie, D. J. (2019) "Compositional analysis of genetically engineered GR2E «golden rice» in comparison to that of conventional rice", *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(28), pp. 7986-7994.

Trijatmiko, K. R., Dueñas, C., Tsakirpaloglou, N., Torrizo, L., Arines, F. M., Adeva, C., Balindong, J., Oliva, N., Sapasap, M. V., Borrero, J., Rey, J., Francisco, P., Nelson, A., Nakanishi, H., Lombi, E., Tako, E., Glahn, R. P., Stangoulis, J., Chadha-Mohanty, P., Johnson, A. A. T., Tohme, J., Barry, G. y Slamet-Loedin, I. H. (2016) "Biofortified indica rice attains iron and zinc nutrition dietary targets in the field", *Scientific reports*, 6, p. 19792.

Vanderschuren, H., Boycheva, S., Li, K.-T., Szydlowski, N., Gruissem, W. y Fitzpatrick, T. B. (2013) "Strategies for vitamin B6 biofortification of plants: a dual role as a micronutrient and a stress protectant", *Frontiers in plant science*, 4(143), pp. 1-7.

Watkins, J. L. y Pogson, B. J. (2020) "Prospects for carotenoid biofortification targeting retention and catabolism", *Trends in plant science*, 25(5), pp. 501-512.

Welsch, R., Arango, J., Bär, C., Salazar, B., Al-Babili, S., Beltrán, J., Chavarriaga, P., Ceballos, H., Tohme, J. y Beyer, P. (2010) "Provitamin A accumulation in cassava (*Manihot esculenta*) roots driven by a single nucleotide polymorphism in a phytoene synthase gene", *The plant cell*, 22(10), pp. 3348-3356.

Wirth, J., Poletti, S., Aeschlimann, B., Yakandawala, N., Drosse, B., Osorio, S., Tohge, T., Fernie, A. R., Günther, D., Gruissem, W. y Sautter, C. (2009) "Rice endosperm iron biofortification by targeted and synergistic action of nicotianamine synthase and ferritin", *Plant biotechnology journal*, 7(7), pp. 631-644.

World Health Organization (2020) *Micronutrients*. Disponible en: https://www.who.int/nutrition/topics/micronutrients/en/ (Accedido: 5 de febrero de 2020).

Wu, T.-Y., Gruissem, W. y Bhullar, N. K. (2019) "Targeting intracellular transport combined with efficient uptake and storage significantly increases grain iron and zinc levels in rice", *Plant biotechnology journal*, 17(1), pp. 9-20.

Ye, X. (2000) "Engineering the provitamin A (β-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm", *Science*, 287(5451), pp. 303-305.

Zheng, L., Cheng, Z., Ai, C., Jiang, X., Bei, X., Zheng, Y., Glahn, R. P., Welch, R. M., Miller, D. D., Lei, X. G. y Shou, H. (2010) "Nicotianamine, a novel enhancer of rice iron bioavailability to humans", *PLOS ONE*, 5(4), e10190.