



universidad
de león



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AMBIENTALES

NUEVAS TECNOLOGÍAS DE EDICIÓN
GÉNICA EN PLANTAS Y SUS
APLICACIONES EN LA MEJORA DE
CULTIVOS

NEW GENE-EDITING TECHNOLOGIES IN
PLANTS AND THEIR APPLICATIONS IN
CROP IMPROVEMENT

Autor: Clara Rodríguez Perandones

Tutor: Hugo Mélida Martínez

Grado en Biotecnología

Julio, 2023

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	5
3. METODOLOGÍA	5
4. CRISPR EN LA NATURALEZA	6
5. COMPONENTES DE CRISPR/Cas9 Y FUNCIONAMIENTO	8
6. TIPOS DE CRISPR	11
7. CRISPR/CAS EN PLANTAS	13
7.2 Selección del gen diana y diseño del sgRNA.	13
7.2 Envío de sgRNA y Cas a las células vegetales	13
7.3 Selección y regeneración de las plantas	15
8. APLICACIONES DE CRISPR EN LAS PLANTAS	16
8.1 Resistencia a enfermedades y plagas de insectos	17
8.2 Mejora de la calidad nutricional	22
9. REGULACION Y PERSPECTIVAS FUTURAS	23
10. CONCLUSIONES	26
11. BIBLIOGRAFÍA	27

Resumen

La creciente población mundial y los desafíos del cambio climático requieren soluciones para alimentar de manera sostenible a la población. Los organismos modificados genéticamente mediante CRISPR/Cas, una técnica de edición genética precisa, ofrecen la oportunidad de mejorar la productividad, calidad y resiliencia de los cultivos para hacer frente a estos desafíos. El objetivo de este Trabajo de Fin de Grado es una revisión del funcionamiento de CRISPR/Cas, especialmente en el contexto de las plantas. Esta tecnología y sus derivados podrían generar nuevas variedades de cultivos importantes con características beneficiosas añadidas. Para ello, se ha estudiado principalmente la mejora en la resistencia biótica, tanto a bacterias, como a virus, hongos y plagas, así como el aumento de la calidad nutricional que aborda problemas de deficiencias nutricionales e intolerancias. Sin embargo, a nivel europeo, todo esto se encuentra sujeto a una rígida legislación que dificulta la libre producción y comercio de estos organismos modificados. Afortunadamente la Unión Europea acaba de anunciar un cambio legislativo conducente a una permisividad de determinados tipos de modificaciones, que también se podrían obtener de manera natural, lo cual abre una nueva etapa para el uso de las tecnologías revisadas en este Trabajo Fin de Grado.

Palabras clave: CRISPR/Cas, edición génica, legislación, mejora vegetal, plantas, OMGs.

Abstract

The world's growing population and the challenges of climate change require solutions to sustainably feed the population. Genetically modified organisms using CRISPR/Cas, a precise gene editing technique, offer the opportunity to improve crop productivity, quality and resilience to meet these challenges. The aim of this thesis is a review of how CRISPR/Cas works, especially in the context of plants. This technology and its derivatives could generate important new crop varieties with added beneficial traits. For this, mainly the improvement of biotic resistance, both to bacteria, viruses, fungi and pests, as well as the enhancement of nutritional quality addressing problems of nutritional deficiencies and intolerances have been studied. However, at the European level, all this is subject to rigid legislation that hinders the free production and trade of these modified organisms. Fortunately, the European Union has just announced a legislative change leading to a permissibility of certain types of modifications, which could also be obtained naturally, which opens a new stage for the use of the technologies reviewed in this Final Degree Project.

Keywords: CRISPR/Cas, genome editing, legislation, plants, plant breeding, GMOs.

1. INTRODUCCIÓN

La población mundial aumenta constantemente, pasando de aproximadamente 3.000 millones de habitantes en 1960 a unos 8.000 millones en 2023, pudiendo alcanzar los 9.700 millones en 2050 (Gómez, 2021). Si se mantiene el mismo rendimiento de cultivos, no habrá suficientes en 2050, y actualmente, cerca de 870 millones de personas sufren desnutrición (Giraldo *et al.*, 2019).

A este crecimiento poblacional, hay que añadir los efectos del cambio climático. En el último siglo, las temperaturas han aumentado alrededor de 0,3°C por década en todo el mundo, y la concentración de CO₂ es un 53% más alta que antes de la revolución industrial. Además, la escasez de agua aumentará, limitando así el crecimiento y la producción de los cultivos (Jiménez *et al.*, 2020). Por tanto, el cambio climático está produciendo una disminución en la tierra agrícola disponible, lo que dificultará aún más cubrir la creciente demanda de alimentos (Giraldo *et al.*, 2019).

Además de aumentar la cantidad de cultivos, debido a la mejora continua del nivel de vida también se requiere aumentar la calidad de estos, lo que le dará más valor en el mercado. Por otra parte, el incremento en la demanda de los cultivos ha provocado una ralentización en la mejora de la calidad (Yang *et al.*, 2022).

Se estima que para satisfacer las necesidades de esta población creciente, la producción mundial de alimentos debe aumentar entre un 60% y un 100% (Jaganathan *et al.*, 2018). Si además se tienen en cuenta los eventos climáticos que originan sobre las plantas un gran estrés ambiental (estrés abiótico), los patógenos (estrés biótico) y la falta de terrenos cultivables, se prevé una gran problemática en la producción de alimentos (Bailey-Serres *et al.*, 2019).

Las biotecnologías agrícolas modernas entre las que se incluye la edición génica, podrían ser una solución al gran problema al que se enfrenta la población mundial (Giraldo *et al.*, 2019). De esta manera, la aplicación de la edición genética en los cultivos podría mejorar la resiliencia de estos e incrementar su rendimiento reduciendo las pérdidas, mejorar el valor nutricional y la resistencia a enfermedades, sin producir un gran impacto ambiental (Jaganathan *et al.*, 2018; Bailey-Serres *et al.*, 2019).

Hasta el descubrimiento de las leyes de Mendel en 1900, se seleccionaban las plantas con caracteres de interés, pero no se sabía la diferencia respecto al resto. Gregor Mendel permite por tanto, el desarrollo y asentamiento de las bases de la mejora genética en este siglo XX,

gracias al descubrimiento de las leyes de la herencia. Estas leyes asocian los rasgos del cultivo a genes y nos permiten conocer el fenotipo de la planta progenitora, fruto de la combinación de los genes de los parentales (Zhang *et al.*, 2021). Todo esto proporciona las reglas básicas de transmisión de características a lo largo de las generaciones. A parte de los cruzamientos de especies emparentadas con características de interés, se comenzó a realizar mutagénesis inducida para obtener mayor variabilidad (**Tabla 1**). Este método consiste en generar cambios aleatorios en la secuencia de DNA de las plantas, mediante tratamientos mutágenos físicos (radiaciones) y químicos (agentes alquilantes) (Chaudhary *et al.*, 2019).

Durante la segunda mitad del siglo XX, se vivió un periodo de auge en la productividad de los cultivos alimentarios: la revolución verde (Pingali, 2012). En esta revolución se pueden diferenciar dos etapas, ambas con la misma misión, acabar con el hambre mundial (Pedraza Olivera, 2013). Durante la primera etapa, avanzada la década de los 50, la mejora genética se centró en producir variedades de alto rendimiento o con un tiempo de maduración más bajo mediante un fitomejoramiento (Pingali, 2012). Se desarrollaron variedades híbridas, con mejores características que las anteriores, proporcionando una garantía sólida de producción (Hamdan *et al.*, 2022). Además, durante este periodo también surgieron técnicas para producir fertilizantes de manera económica y se extendió el uso de pesticidas (Pingali, 2012). Sin embargo, las técnicas de mejora convencionales utilizadas hasta ese momento, tenían una serie de desventajas, como las mutaciones genéticas incontroladas, el largo y laborioso procedimiento de cruzamientos y retrocruzamientos y la necesidad de que las plantas que se van a cruzar estén estrechamente relacionadas, pudiendo así producir descendencia (Hamdan *et al.*, 2022). En los años 80 comenzó la segunda etapa de esta revolución verde, llamada comúnmente revolución genética, en la que la biotecnología se fusionó con la ingeniería genética, lo que originó grandes aumentos en la productividad de la agricultura mundial (**Tabla 1**) (Ceccon, 2008). La base de esta nueva etapa es la tecnología del DNA recombinante (ingeniería genética), usada para generar cultivos transgénicos resistentes a herbicidas o pesticidas (**Tabla 1**). Todo esto, junto con el desarrollo de técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, permite el empleo de la transgénesis para introducir en las plantas genes incluso de reinos diferentes, sin modificar el fondo genético del cultivo, por lo que no habrá efectos pleiotrópicos, y el tiempo requerido para esto es de una generación, lo que se facilita el proceso (Hamdan *et al.*, 2022).

En 1983 se produjo la primera planta transgénica, tabaco (*Nicotiana tabacum*) resistente a Kanamicina, mediante *Agrobacterium tumefaciens* (Hamdan *et al.*, 2022). Esta bacteria

patógena tiene la capacidad de infectar plantas al transferir un fragmento de su plásmido Ti (T-DNA) a las células vegetales, que se integra de manera estable en el genoma. Mediante ingeniería genética, es posible reemplazar los genes del T-DNA con genes de interés, incluso si son de una especie diferente (Bandurska *et al.*, 2016). A partir de aquí, se desarrollaron variedades transgénicas que nos permiten obtener mejores cualidades nutricionales, mayor resistencia a estrés abiótico y biótico y mayor productividad, todo ello requiriendo menos recursos naturales (Hamdan *et al.*, 2022).

Tabla 1. Técnicas de mejora vegetal basadas en biotecnología para introducir nuevas características (Gao, 2021).

Mejoramiento genético por cruzamiento	Mejoramiento genético por mutación	Mejoramiento genético mediante transgénesis	Mejoramiento genético por edición genética
Introducir rasgos de los genomas parentales.	Mutagénesis aleatoria.	Introducción de rasgos de otros organismos.	Mutagénesis dirigida.
Se requiere retrocruzamiento.	Se requiere retrocruzamiento.	El ADN extraño se integra.	No se requiere retrocruzamiento.
Libre de transgenes	Libre de transgenes	Sujeto a regulación.	Libre de transgenes
8-10 años	8-10 años	8-12 años	2-5 años

De manera global, desde que se comenzaron a cultivar las plantas transgénicas en 1996 ha aumentado de manera considerable su área de cultivo pasando de 1,7 millones de hectáreas cultivadas a 190,4 millones en 2019. El 88% de esta área cultivada se encuentra en América, mientras que Europa solo cuenta con el 0,05% el área mundial. El principal productor en 2019 de cultivos transgénicos fue Estados Unidos con 71,5 millones de hectáreas cultivadas (**Fig. 1**) (Hamdan *et al.*, 2022). En 2019, España ocupa el puesto 17 en el ranking de áreas cultivadas con 0,1 millones de hectáreas de maíz transgénico. El 48% de la superficie cultivada a nivel mundial correspondió a soja, el 32% a maíz y el 14% a algodón, siendo estos los cultivos principales (Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología, 2023). La mayor parte de estos cultivos que se producen no son de consumo humano, por ejemplo, tan solo el 12% del maíz producido se destina como alimento, el 55% para pienso y el 20% restante tiene un uso no alimentario (Turnbull *et al.*, 2021). Los cultivos más sembrados son los resistentes a herbicidas y/o insectos. Los beneficios económicos obtenidos por 18 millones de agricultores alcanzan 229,4 mil millones de dólares. El 95% de estos agricultores son pequeños agricultores y el beneficio no se debe únicamente a un aumento de rendimiento sino también a un ahorro de recursos. (Asociación de Biotecnología Vegetal Agrícola, 2020). Entre 1996 y el 2012 en Estados Unidos se produjo un aumento de más de 370 millones de toneladas de cultivos alimentarios y un séptimo de este aumento se debe a la edición genética en las plantas. Esto solo es una evidencia de la importancia de la incorporación de variedades transgénicas a nuestra agricultura (Jouve de la Barreda, 2020). En resumen, los cultivos transgénicos han aportado y

aportarán mucho a nuestra sociedad.

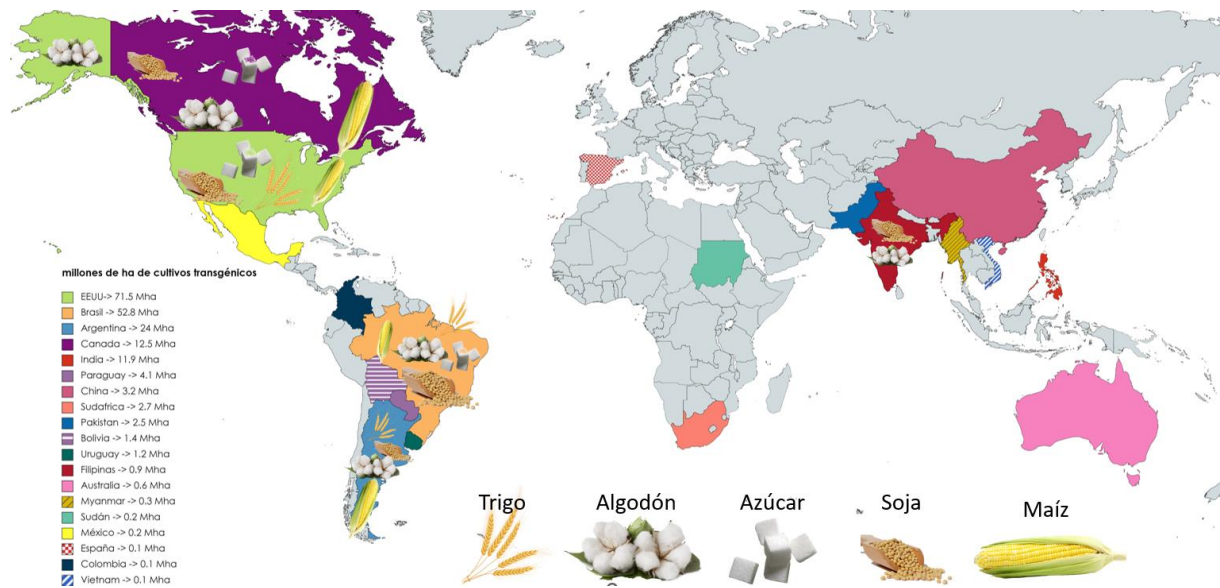


Figura 1. Mapa mundial de los países con más de 0.1 millones de hectáreas (Mha) de cultivos transgénicos junto al ranking de área cultivada de estos. Representación de los 5 cultivos transgénicos más cultivados en los 5 primeros países del ranking (Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología, 2019). Imagen realizada con MapChart.

Desde el año 2009 se utilizan unas nuevas tecnologías para la modificación genética de plantas basadas en nucleasas de restricción específicas de secuencia. Esto marca una diferencia con la primera generación de plantas transgénicas, en las que la inserción en el genoma de la modificación era de manera aleatoria. Destacan las nucleasas con dedos de zinc (ZFN) que surgieron primero, y las nucleasas de actividad similar a activadores de transcripción (TALEN) (Hamdan *et al.*, 2022). Ambas están formadas por una cadena de aminoácidos, que se encarga de reconocer los nucleótidos. En el caso de los ZFN, 3 o 4 aminoácidos reconocen un triplete de bases, por lo que si se fusionan varios ZFNs en tándem, se reconocerán varios grupos de tres nucleótidos. En el caso de los TALEN, son secuencias de 33-35 aminoácidos, en los que dos aminoácidos reconocen un nucleótido concreto, por ello serán más específicos que los anteriores. En los dos casos, las secuencias de aminoácidos están asociadas a la endonucleasa FokI. Cambiando los aminoácidos de las cadenas se pueden reconocer secuencias de varios nucleótidos concretos (Liu *et al.*, 2021).

Años más tarde, el sistema CRISPR/Cas llamó la atención de los científicos, convirtiéndose en el método más popular de edición genética. Fue utilizado por primera vez en plantas en el año 2013. En comparación con las nucleasas anteriores, este método es más eficiente, rápido y sencillo, ya que no se requiere de una ingeniería de proteínas compleja, porque el reconocimiento de la secuencia diana va dictado por la complementariedad con una cadena de

RNA guía, que se puede sintetizar de manera sencilla (Liu *et al.*, 2021). Hay evidencias de que CRISPR en el campo agrícola mejora de una manera significativa el rendimiento y la resistencia al estrés ambiental. A pesar de su gran potencial, los principales desafíos a los que se enfrenta son aumentar la eficiencia, mejorar la precisión de los sistemas de entrega y evitar los impactos fuera del objetivo (Li *et al.*, 2021).

2. OBJETIVOS

En base a lo mencionado anteriormente, el objetivo general es adquirir un profundo entendimiento del funcionamiento de CRISPR, especialmente en el contexto de las plantas. Para alcanzarlo, se proponen los siguientes objetivos parciales:

- 1-Se buscará comprender los componentes fundamentales de esta tecnología y cómo se aplican en la modificación genética de las plantas.
- 2- Realizar una revisión exhaustiva de diversos artículos científicos recientes, que utilizan CRISPR para desarrollar plantas con resistencia biótica y mejores valores nutricionales.
- 3- Investigar la legislación vigente en la Unión Europea y en otros países en lo que respecta a los organismos modificados mediante las nuevas técnicas genómicas, entre las que incluimos a CRISPR/Cas, y evaluar su futuro.

3. METODOLOGÍA

La búsqueda de información para realizar este trabajo bibliográfico, se realizó a través de los siguientes motores de búsqueda:

- Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>).
- Google académico (<https://scholar.google.es/schhp?hl=es>).
- Science direct (<https://www.sciencedirect.com/>).
- Crop Biotech Update (<https://www.isaaa.org/kc/cropbiotechupdate/default.asp>).

A lo largo del trabajo, se han utilizado estas plataformas para la búsqueda de artículos científicos, a excepción de la última, que se empleó para llevar a cabo un análisis sobre los cultivos transgénicos que se permiten cultivar en cada país en la actualidad, con el propósito de crear **Figura 1**. Para agilizar las búsquedas de los artículos, se aplicaron una serie de filtros. Por ejemplo en Pubmed, base de datos más utilizada, se selecciona inicialmente la ubicación deseada de las palabras clave, ya sea en el título o en cualquier parte del texto, y se utilizan los operadores correspondientes (*and*, *or* y *not*). Posteriormente, se estableció el rango de fechas

de publicación de los artículos. En el caso de la búsqueda de publicaciones relacionadas con CRISPR, el rango se limitó desde 2021 hasta la actualidad. Además, se tuvo la opción de elegir diferentes organismos de los cuales se deseaba obtener información, en este caso particular, se enfocó en plantas.

En este trabajo, se utilizó Microsoft Word del paquete Office como software de edición de texto. Las imágenes utilizadas en el trabajo, excepto aquellas obtenidas de artículos científicos, se crearon mediante el uso de la herramienta en línea BioRender (<https://www.biorender.com/>). En el caso de la **Figura 1**, correspondiente a un mapa político del mundo, se usó MapChart (<https://www.mapchart.net/>) que permitió realizar un mapa con colores y descripciones personalizadas.

El desarrollo del trabajo se llevo a cabo en cinco etapas generales: en la primera de ellas se realizó una investigación exhaustiva sobre la importancia de la edición genética y su evolución a lo largo de la historia. En la segunda, se exploró en detalle el mecanismo de CRISPR/Cas, tanto en la naturaleza como en la edición genética, así como los diferentes tipos de sistemas CRISPR. En tercer lugar, se describió el procedimiento para llevar a cabo una modificación genética mediante CRISPR/Cas en plantas. En la cuarta etapa se realizó una búsqueda de estudios empíricos recientes de aplicaciones de CRISPR en las plantas, enfocándonos en la resistencia a estrés biótico y en el aumento de la calidad nutricional. Por último, se analizó la fuerte regulación a la que se encuentran sometidos estos sistemas CRISPR. Cada una de estas etapas contribuyó a obtener una comprensión completa de la tecnología CRISPR/Cas y sus implicaciones en la mejora genética de las plantas.

4. CRISPR EN LA NATURALEZA

En 1987, Yoshizumi Ishino descubrió una secuencia repetida de 14 pares de bases intercalada con secuencias espaciadoras en *Escherichia coli*. En 1995, Francisco Mojica y sus compañeros identificaron estas repeticiones en arqueas y posteriormente propusieron que formaban parte del sistema inmunológico adaptativo y heredable de bacterias y arqueas, ya que las secuencias espaciadoras mostraban homología con genomas de fagos. En 2002, se acuñó el término "Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats" (CRISPR) para estas regiones. (Ishino *et al.*, 2018; Gostimskaya, 2022). Este sistema de inmunidad adquirida actúa de la siguiente manera (**Fig. 2**):

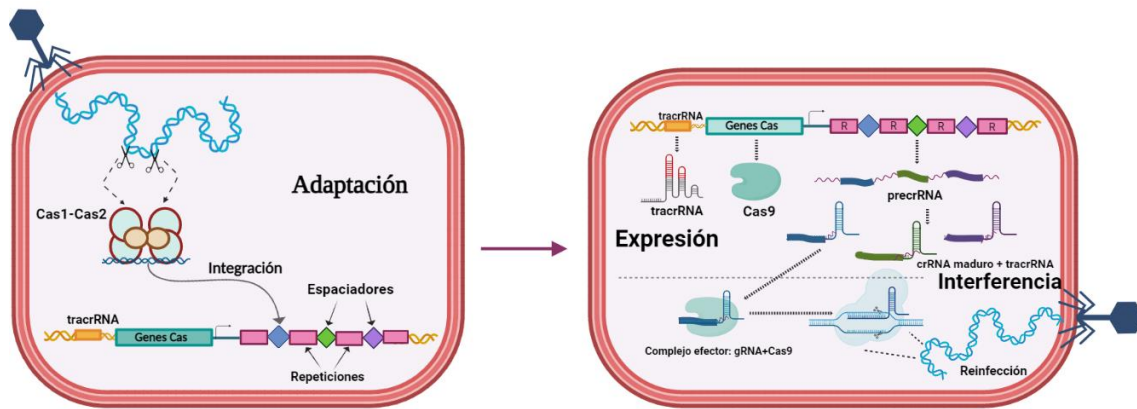


Figura 2. Representación gráfica de los tres pasos del proceso de inmunidad adaptativa heredable mediante CRISPR/Cas de bacterias y arqueas. Imagen realizada con Biorender.

- ❖ **Adaptación:** En este primer paso se crea una “memoria” de los fagos que han ido infectando las bacterias y arqueas. Cuando se produce la infección del virus y este introduce su material genético, proteínas Cas, que normalmente son Cas1 y Cas2 forman un complejo, reconocen el DNA invasor y cooperan para capturar los fragmentos de DNA del virus. El complejo Cas1-Cas2 junto con proteínas accesorias, cortan el genoma viral en fragmentos de tamaño necesario, generando extremos 3’OH que realizan un ataque nucleofílico a los extremos 5’ de la primera repetición, insertando una nueva secuencia espaciadora y generando gracias a la maquinaria de reparación de DNA, una nueva repetición. Así se almacena en el genoma de la bacteria o de la arquea un recuerdo del fago (Cueva Garcés, 2019).
- ❖ **Expresión:** Las bacterias y arqueas transcriben la matriz CRISPR con las secuencias repetidas y las espaciadoras formando varias copias de largas cadenas de RNA, llamadas RNA precursor CRISPR (pre-crRNA). Estas largas cadenas de pre-crRNA son cortadas en puntos específicos de las repeticiones por las proteínas Cas. Finalmente, cada segmento (crRNA) consta de una secuencia espaciadora y parte de las secuencias repetidas que la flanquean. Las proteínas Cas utilizarán estos crRNA para identificar nuevas infecciones de fagos coincidentes. (Cueva Garcés, 2019).
- ❖ **Interferencia:** Es el último paso del proceso de inmunidad adquirida. Cada segmento de crRNA maduro forma un complejo efector con una o más proteínas Cas y el RNA de CRISPR asociado a la transactivación, el tracrRNA. Cuando se produce una nueva infección de un virus a una bacteria o arquea y este inyecta su DNA, el complejo efector busca una secuencia denominada protoespaciador, que coincida con la secuencia espaciadora que contiene su crRNA. Una vez se ha localizado el protoespaciador, el complejo desnaturaliza la doble hebra del DNA del virus y el RNA se une al protoespaciador mediante bases complementarias. Las

proteínas Cas cortan el DNA del virus destruyendo así la información para su replicación y deteniendo la posible infección (Cueva Garcés, 2019).

En los siguientes años se continuó investigando el funcionamiento de CRISPR y descubriendo poco a poco todos sus componentes. Así, lo que parecía un hallazgo relevante para la microbiología ha revolucionado el mundo de la manipulación genómica como explicaré a continuación (Gostimskaya, 2022). En 2020 se le otorgó el Premio Nobel de Química a Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna, que demostraron que un mecanismo de inmunidad microbiana, puede transformarse en un sistema de edición de cualquier genoma de una manera sencilla, económica y eficiente (Westermann *et al.*, 2021).

5. COMPONENTES DE CRISPR/Cas9 Y FUNCIONAMIENTO

El sistema CRISPR/Cas es utilizado por bacterias y arqueas como sistema de inmunidad adaptativa frente a DNA exógenos, como se ha explicado anteriormente. En la actualidad se han encontrado regiones CRISPR en la mayoría de las arqueas y en la mitad de las bacterias estudiadas, pero no en eucariotas ni en virus (Gostimskaya, 2022). En cada matriz CRISPR hay una serie de secuencias espaciadoras no conservadas que corresponden al material genético exógeno, flanqueadas por repeticiones directas, cortas, con poca variación y palindrómicas (Riveros-Maidana *et al.*, 2020). Antes de la matriz CRISPR, se localiza una secuencia líder con una extensión de cientos de pares de bases. Esta secuencia no presenta marco de lectura, por lo que no codifica para ninguna proteína y en ella se encuentra el promotor para la transcripción de la matriz CRISPR (Beunza González, 2019). La matriz CRISPR se encuentra asociada a una serie de genes *cas* que codifican para las proteínas Cas que son las nucleasas en el sistema CRISPR/Cas. Por último, aparece la secuencia *tracrRNA*, una secuencia codificante que se encarga del ensamblaje del complejo efector uniendo la proteína Cas con el *crRNA* (Vicente Valor, 2018). Todo ello forma el locus CRISPR (**Fig. 3**).

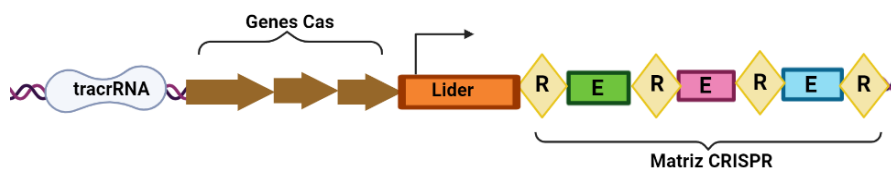


Figura 3. Representación del locus CRISPR con la matriz CRISPR, la secuencia líder, los genes *cas* y la secuencia que codifica para el *tracrRNA*. Imagen realizada con Biorender.

Para realizar el corte, se requieren dos condiciones: (I) complementariedad entre las bases del *crRNA* y la secuencia diana y (II), que esta última esté ubicada adyacente a un motivo conocido como motivo adyacente protoespaciador (PAM), el cual consiste en una secuencia de 2 a 5 nucleótidos de DNA. La composición y tamaño del PAM pueden variar entre diferentes

especies. En el ámbito de la edición genética, se utiliza ampliamente el PAM 5'NGG3' para la enzima Cas9 derivada de *Streptococcus pyogenes*, debido a su corta longitud y a su amplia presencia en los genomas. La presencia de esta secuencia PAM evita que se produzca el corte en el propio locus de CRISPR de la célula procariota, ya que estas secuencias PAM están ausentes en dicho locus (Vicente Valor, 2018).

Se distinguen diversos tipos de proteínas Cas, que se dividen en dos clases: en la primera clase se incluyen las de tipo I, III y IV y en la segunda clase los tipos II, V y VI. La diferencia entre las dos clases es que en la clase II tan solo se utiliza una proteína Cas multidominio, mientras que en la clase I se dan complejos de proteínas Cas de varias subunidades. El sistema CRISPR/Cas9 es el mejor caracterizado y más utilizado en edición genética, es un sistema tipo II y pertenece a la segunda clase (Riveros-Maidana *et al.*, 2020).

El sistema CRISPR/Cas9 está formado por una endonucleasa Cas9 que es guiada por el RNA guía (gRNA), formado por el crRNA y el tracrRNA, hasta el lugar del genoma donde debe realizar la escisión de doble cadena (Riveros-Maidana *et al.*, 2020). El componente principal del sistema CRISPR/Cas9 es la endonucleasa Cas9. Presenta una estructura bilobular, un lóbulo con función nucleasa denominado NUC y un lóbulo de reconocimiento REC (Mengstie y Wondimu, 2021). Ambos lóbulos se encuentran separados por un canal en el que se inserta el gRNA (Pardo Piñón, 2017). El lóbulo NUC consta de 4 dominios, dos de ellos con función nucleasa de doble hebra, HNH y RuvC, un dominio WED y un dominio Pi, que interacciona con la secuencia PAM del DNA diana. Por otro lado, el lóbulo REC consta de los dominios REC1, REC2, REC3 y BH (Leonova y Gainetdinov, 2020). Los dominios REC se encargan de la unión con gRNA y el BH comienza la actividad de escisión. El crRNA tiene una longitud de 42 nucleótidos y una secuencia en su extremo 5' que es la que se emparejará por complementariedad con la secuencia diana, que tiene una longitud de 20 nucleótidos. El tracrRNA tiene una longitud de 80 nucleótidos y se une al crRNA para formar el gRNA por una secuencia repetida de 22 nucleótidos que se encuentra en el extremo 3' del crRNA (Xue y Greene, 2021).

El mecanismo de edición genética por parte del sistema CRISPR/Cas9 se puede dividir en tres pasos: reconocimiento, escisión y reparación. La endonucleasa Cas9 permanece inactiva hasta que se une al gRNA diseñado (sgRNA), que es complementario a la secuencia diana del genoma y guiará a la endonucleasa. Una vez se unen Cas9 y sgRNA, se forma el complejo efector (**Fig. 4**). Su primer paso es la búsqueda de la secuencia PAM que se encuentra aguas abajo del lugar

donde se producirá el corte en la cadena no complementaria al gRNA, que se va a reconocer gracias al dominio Pi. Una vez se ha encontrado esta secuencia PAM y la secuencia complementaria al sgRNA, se desencadenará la desnaturalización local del DNA y se producirá una hibridación RNA-DNA, ya que son complementarios, y se posicionará en el surco central de Cas9. El dominio HNH realiza el corte en la secuencia complementaria y el RuvC en la no complementaria del DNA diana, para producir el corte de la doble hebra de DNA ("double-strand break", DSB) de extremos romos. Este DSB será reparado por la propia maquinaria de reparación de la célula (Mengstie y Wondimu, 2021).

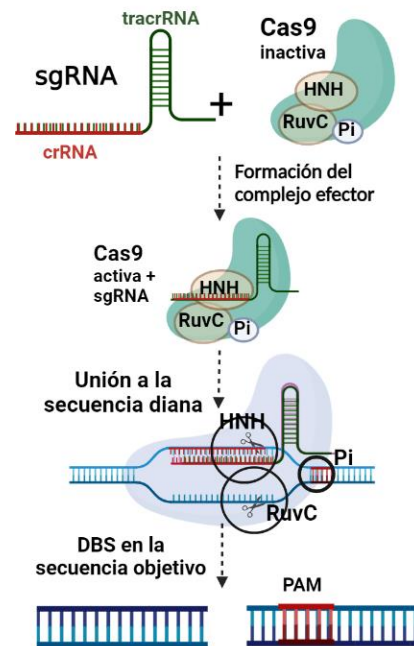


Figura 4. Representación de manera esquemática de un proceso de corte en un genoma mediado por CRISPR/Cas9. Imagen realizada con Biorender.

La ruptura de la doble cadena del DNA se produce de manera común durante la división o la diferenciación celular y causa lesiones como el reordenamiento cromosómico, la inestabilidad genómica y la muerte celular. Para contrarrestar estos efectos, las células cuentan con diversos mecanismos de reparación (Leonova y Gainetdinov, 2020). Estos mecanismos se han aprovechado en la edición genética permitiendo la inserción, eliminación o reemplazo de fragmentos de DNA. Entre los mecanismos de reparación existentes, destacan dos vías, siendo las más utilizadas la reparación dirigida por homología ("homology-directed repair", HDR) y la unión de extremos no homólogos (NHEJ) (**Fig. 5**) (Xue y Greene, 2021).

La reparación dirigida por homología (HDR) es muy precisa. Requiere una secuencia molde de DNA de doble cadena con homología a las regiones flanqueantes en la escisión a reparar, para que así la célula la incorpore mediante recombinación homóloga. Esta secuencia se puede añadir de manera exógena, por lo que se podrán introducir mutaciones precisas o incluso reemplazar genes (Xiong *et al.*, 2016). Por otro lado, NHEJ se utiliza cuando se quiere inhabilitar la función de un gen. Produce la unión de fragmentos de DNA mediante un proceso enzimático, sin requerir de secuencia homóloga de DNA. Esto puede resultar en inserciones o deleciones al azar, que pueden provocar mutaciones en el marco de lectura o incluso codones de parada. Aunque este mecanismo sea el predominante puede causar mutaciones con grandes efectos adversos (Mengstie y Wondimu, 2021).

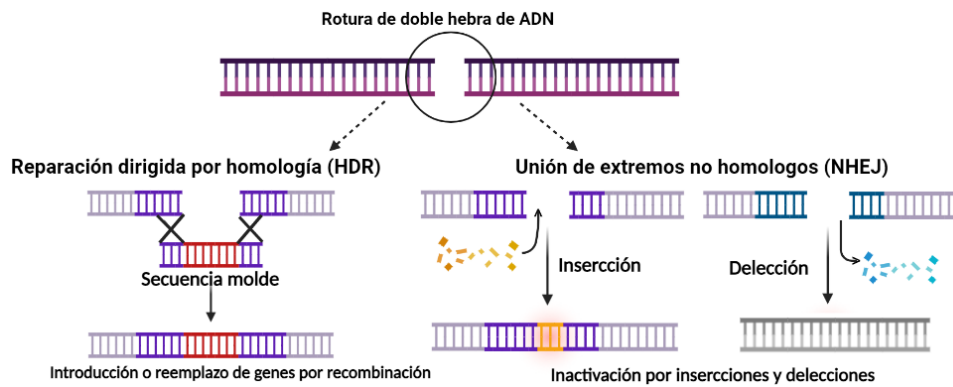


Figura 5. Representación gráfica de las dos vías principales de reparación de DNA celular tras una rotura de doble hebra, además de las aplicaciones de cada una de estas vías en la edición genética. Imagen realizada con Biorender.

6. TIPOS DE CRISPR

Como se mencionó previamente, existen al menos 6 tipos de sistemas CRISPR. Además, se han realizado modificaciones a los tipos existentes con distintos fines, como mejorar el rendimiento. En este apartado se describirán cada uno de estos tipos y sus aplicaciones a excepción del sistema CRISPR/Cas9 de tipo 2 ya descrito.

Los sistemas de tipo V, como CRISPR/Cas12, incluyen endonucleasas como Cas12a o Cpf1, que no requieren tracrRNA y tienen un único dominio endonucleasa llamado RuvC. Estas endonucleasas generan extremos cohesivos de 5' a diferencia de los extremos romos de la Cas9, al escindir ambas hebras del ADN, lo que facilita la integración del gen (Liu *et al.*, 2020). Los PAM de estos sistemas suelen ser ricos en timinas, siendo más difícil de encontrar esta secuencia que la de Cas9, rica en guaninas, por lo que se producirán menos cortes fuera del objetivo (Liu *et al.*, 2022). Existen estudios comparativos entre el sistema CRISPR/Cas12 y el sistema CRISPR/Cas9 en plantas, como el silenciamiento del gen *epfl9* en el arroz, demostrando un mayor número de plantas mutadas con Cas12 (Alok *et al.*, 2020). Los 6 subtipos de Cas13 pertenecen a los sistemas de tipo VI, CRISPR/Cas13. Estas endonucleasas guiadas por crRNA contienen dos dominios HEPN con actividad ribonucleasa, generando cortes en el RNA y degradando el RNA de cerca del corte. Estos sistemas se usan en plantas sobre todo para atacar a virus de RNA o eliminar/modificar el mRNA (Kavuri *et al.*, 2022).

La clase 1 de sistemas CRISPR/Cas, aunque sea la más abundante es la menos utilizada. Dentro de estos, el más utilizado es el tipo I, especialmente para realizar deleciones largas (Liu *et al.*, 2022). Estos sistemas forman el complejo efector "Cascade", que se une al crRNA y al ADN diana y recluta una nucleasa llamada Cas3 para realizar el corte. (Young *et al.*, 2019). Las nucleasas de tipo III guiadas por crRNA se forman por la fusión de una Cas7 y una Cas9, que

reconocen y escinden el RNA (Liu *et al.*, 2022). Por último, los sistemas de tipo IV son los más desconocidos, siendo su diana moléculas de RNA (Zhou *et al.*, 2021).

Además, se han realizado modificaciones en las proteínas Cas para ampliar las aplicaciones de la tecnología CRISPR. Cabe destacar la “nickase Cas9” (nCas9) que surgió con el objetivo de solventar los cortes fuera del objetivo y tiene una mutación en uno de los dos dominios nucleasa, produciendo una rotura monocatenaria (Leal *et al.*, 2022). Una de las aplicaciones de nCas9 es la edición de bases (**Fig. 6**), muy utilizada para obtener plantas resistentes a herbicidas (Karlson *et al.*, 2021). Se fusiona la nCas9 con un editor de bases, ya sea para citosina o adenina, lo que permite realizar mutaciones de transición específicas. Otra aplicación es la edición primaria (**Fig. 6**), capaz de realizar también las 8 conversiones. En la edición participan junto con una transcriptasa reversa (RT) y un pegRNA (Kantor *et al.*, 2020).

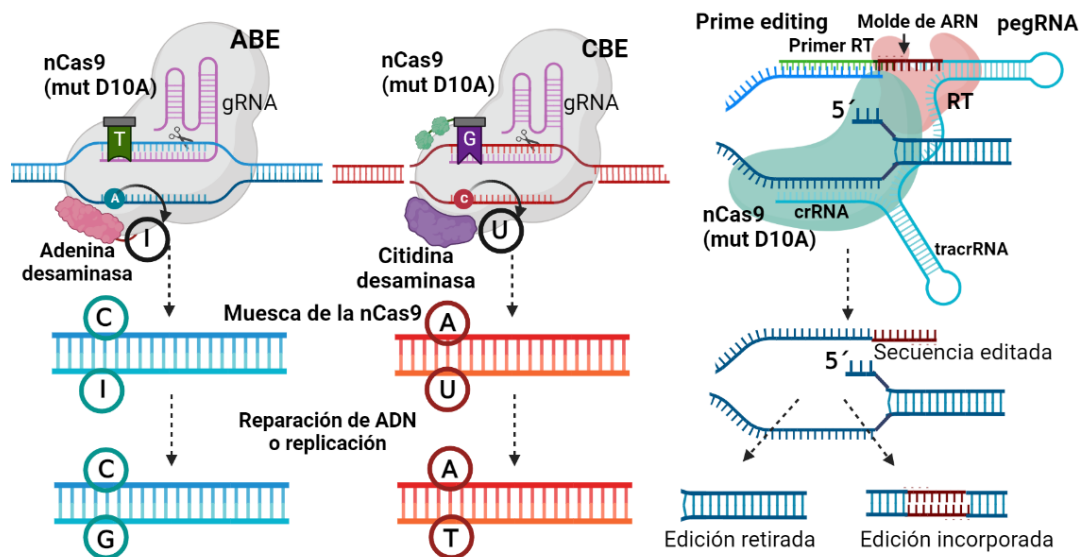


Figura 6. Representación de manera gráfica del proceso de edición de bases de adenina (ABE) y de citosina (CBE) y de la edición primaria. Imagen realizada con Biorender.

Existe otra nucleasa denominada “deadCas9” (dCas9) con ambos dominios nucleasas mutados, de forma que carece de función nucleasa, pero conserva la acción de reconocimiento por complementariedad de una secuencia diana. Se emplea como mecanismo de regulación de la transcripción asociándose con activadores o inhibidores de esta, regulando así la expresión de un gen sin modificar el genoma (Yang *et al.*, 2021). Por ejemplo, se ha utilizado la fusión de dCas9 con una acetiltransferasa para activar la proteína de unión al ácido abscísico (ABA) en *Arabidopsis thaliana*, mejorando la tolerancia a la sequía (Karlson *et al.*, 2021).

7. CRISPR/CAS EN PLANTAS

La tecnología CRISPR se ha utilizado para editar el genoma de distintas especies de plantas con éxito. Para la edición de una célula vegetal hay que seguir los siguientes pasos:

7.2 Selección del gen diana y diseño del sgRNA.

El primer paso para realizar una modificación en las células vegetales es localizar la secuencia diana de unos 20 pares de bases, seguida de un PAM específico para la nucleasa que se vaya a usar. Para ello, se requiere que el genoma esté secuenciado y bien caracterizado. La elección de esta secuencia diana dentro del gen objetivo depende de si se quiere realizar una edición génica, en cuyo caso esta debe estar en los exones o regiones codificantes o de si se quiere modular la expresión génica. En este segundo caso se llevará a cabo en promotores o sitios de unión de reguladores de la transcripción (Vicente Valor, 2018).

Los sgRNA con la secuencia complementaria a la secuencia diana, suelen contener un promotor de RNA polimerasa III. En plantas se han utilizado los promotores U6 y U3, cuya transcripción se inicia con una G o una A respectivamente. Tanto la selección de la secuencia diana como el diseño de los sgRNA, se deben de realizar de modo computacional, maximizando la eficiencia y minimizando los cortes fuera del objetivo (He *et al.*, 2017). Existen múltiples herramientas en línea para ello (**Tabla 2**).

Tabla 2. Distintos recursos en línea para diseñar sgRNA (Jamee *et al.*, 2022).

Nombre	Referencia	Función
CRISPRdirect	https://crispr.dbcls.jp/	Diseño de sgRNA con efectos off-target reducidos.
CRISPRp	http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/	Diseño de sgRNA en plantas.
CHOPCHOP	https://chopchop.cbu.uib.no/	Diseño de sgRNA en todos los organismos y evaluación de la eficiencia de corte.
Benchling	https://www.benchling.com/crispr	Diseño de sgRNA.
E-CRISP	http://www.e-crisp.org/E-CRISP/	Diseño de sgRNA en todos los organismos.
Cas-OFF	http://www.rgenome.net/cas-offfinder/	Busca puntos de off-target.

7.2 Envío de sgRNA y Cas a las células vegetales

La forma en la que se entregan los componentes del sistema CRISPR/Cas es de crucial importancia para determinar si se obtiene una planta editada transgénica o una planta editada no transgénica, que podría regirse por un marco regulatorio diferente al de los organismos modificados genéticamente tradicionales. Para realizar el envío de la maquinaria necesaria para la edición génica a las células vegetales aisladas, hay que tener en cuenta que estas presentan

una pared celular que rodea el protoplasto y supone un impedimento mecánico para su introducción (Sandhya *et al.*, 2020).

Así pues, los métodos de envío de maquinaria a las células vegetales, se pueden clasificar como DNA-independientes o DNA-dependientes. En el caso de los DNA-independientes, se introducen directamente el sgRNA y la nucleasa Cas que se vaya a utilizar o el mRNA, y se obtendrán plantas editadas no transgénicas, ya que estos se degradarán una vez realizada la modificación. Sin embargo, aunque esta sería la mejor opción se enfrenta al problema nombrado de la existencia de una barrera mecánica, como es la pared celular de las células vegetales. Debido a las limitaciones que presentan estas estrategias, a veces hay que recurrir a las de DNA-dependientes en las que se usan vectores que portan las secuencias codificantes para la nucleasa Cas y el sgRNA, con la posibilidad de que el DNA exógeno se inserte generando plantas transgénicas (Laforest y Nadakuduti, 2022)

Actualmente, la entrega de los componentes es el mayor cuello de botella en la ingeniería genética vegetal (Laforest y Nadakuduti, 2022). Se suelen utilizar tres métodos: la biobalística, la electroporación y la entrega por agrobacterias. Los dos primeros se pueden utilizar tanto con estrategias DNA-independientes como -dependientes, sin embargo el tercero se incluye dentro de las estrategias DNA-dependientes. La biobalística, consiste en una “pistola de genes” que lanza a alta presión partículas de oro, plata o tungsteno, recubiertas con los componentes CRISPR/Cas, a un material vegetal que suele consistir en embriones inmaduros. Los componentes se liberarán, realizarán los cambios correspondientes y se podrá regenerar una planta editada. Sin embargo, con este método hay una menor eficiencia de edición y es más costoso. En el caso de utilizar polietilenglicol (PEG) como puente molecular entre la membrana del protoplasto y el vector de codificación para las herramientas CRISPR, el problema es que hay que obtener células vegetales desprovistas de pared celular. Sin embargo, no todas las plantas se pueden regenerar a partir de protoplastos, ni es fácil el aislamiento de estos, por lo que hay que buscar un método más eficaz y eficiente. Por último, la utilización de *Agrobacterium* es actualmente el método más usado debido a su alta eficiencia, su amplia aplicabilidad dentro de su rango de huéspedes limitado y su bajo coste (Sandhya *et al.*, 2020). Sin embargo, con este método se requiere un genotipo no solo competente para su regeneración, sino también para su transformación con *Agrobacterium*. Para ello se inserta el transgén (secuencia que codifica para el sgRNA y la Cas) en un plásmido binario en la zona que corresponde con el T-DNA. Este se introduce en *Agrobacterium*, por ejemplo mediante electroporación, y posteriormente estas bacterias infectarán a las células vegetales en los tejidos

diana, introduciendo el T-DNA en su genoma (Fernández Donas, 2022). Estos tres métodos de transformación se ilustran a continuación en la **Figura 7**.

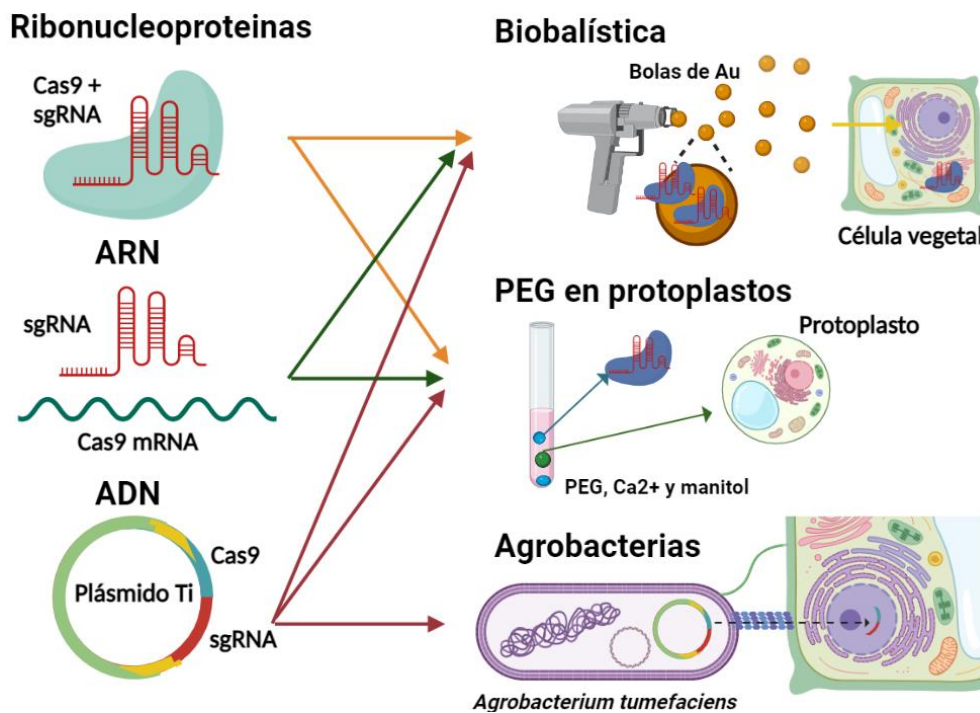


Figura 7. Representación gráfica de los tres métodos principales de transformación genética en las células vegetales de la maquinaria CRISPR. Imagen realizada con Biorender.

7.3 Selección y regeneración de las plantas

En el caso de utilizar métodos DNA-dependientes para realizar la edición, se puede incluir un gen de selección, típicamente de resistencia a antibiótico o herbicida, para saber que células han sido editadas y cuales no. La regeneración de los explantos editados por cualquier estrategia se suele realizar por organogénesis adventicia o por embriogénesis somática (**Fig. 8**) (Impens *et al.*, 2022). La embriogénesis somática es una vía de regeneración adventicia de plantas en la que las células somáticas se desdiferencian en células madre embrionarias que originan plantas completas a través del desarrollo embrionario. Existe la embriogénesis indirecta en la que las células desdiferenciadas originan callos embrionarios totipotentes asociados con variaciones somaclonales y la embriogénesis directa, que carece de la fase de formación del callo. La vía indirecta es más larga debido a la inducción de callos, pero es en la que más plántulas se regeneran. En el caso de la organogénesis *de novo*, se regeneran yemas que forman brotes y que desarrollan tallos de los que crecen raíces. En la organogénesis indirecta se forma un callo no embrionario pluripotente. Este proceso no es muy adecuado para la transgénesis debido a la producción de brotes quiméricos (Long *et al.*, 2022).

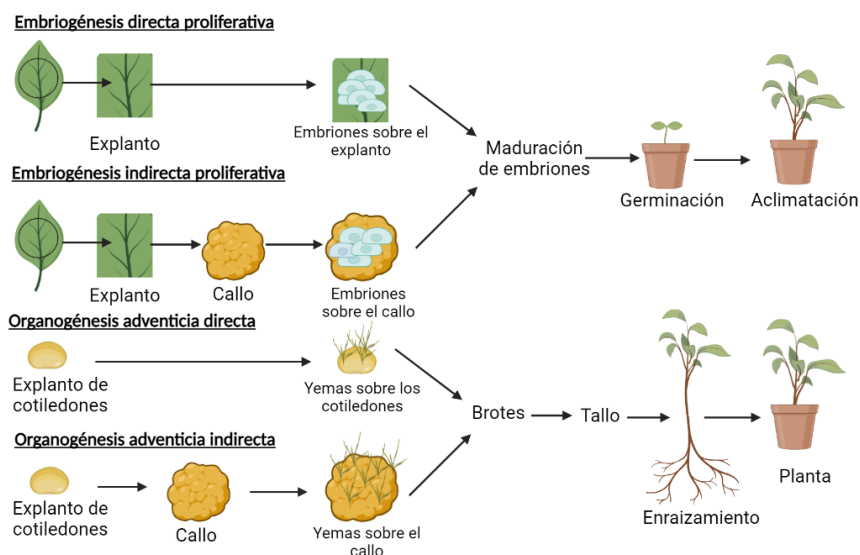


Figura 8. Representación esquemática de los 4 procesos de regeneración de plantas más usados en edición genética. Imagen realizada con Biorender.

La embriogénesis somática frente a la organogénesis tiene un potencial de multiplicación mayor y un riesgo de variación somaclonal menor, ya que proviene de una sola célula y la probabilidad de que mute esa célula es más baja que la de que mute alguna de las que va a formar la yema (Laforest y Nadakuduti, 2022).

Cada vez existen más métodos para mejorar la frecuencia de regeneración de las plantas y su tasa de transformación, como la inclusión de reguladores del desarrollo en los vectores de edición de *Agrobacterium* (Laforest y Nadakuduti, 2022).

Una vez regeneradas las plantas, hay que validar su edición para ver si se han obtenido plantas sin modificar, editadas o transgénicas, sobre todo en el caso de que no haya existido una previa selección. La validación puede ser mediante la realización de una PCR (Shih *et al.*, 2022), mediante secuenciación, ya sea de una parte del genoma o del genoma completo, ensayos de restricción y electroforesis (Vicente Valor, 2018). En el caso de obtener una planta transgénica, se puede conseguir eliminar las herramientas CRISPR mediante cruzamientos con plantas sin modificar, consiguiendo en parte de la descendencia, el DNA con los cambios deseados y no las herramientas CRISPR, aunque esto requiere de tiempo y costes adicionales.

8. APLICACIONES DE CRISPR EN LAS PLANTAS

La edición génica mediante CRISPR/Cas tiene multitud de aplicaciones en plantas, entre las que están las siguientes: investigación básica, mejora contra estrés abiótico y biótico, aumento de la producción, y mejora de la calidad nutricional. Este trabajo se va a centrar en analizar las

últimas técnicas para la resistencia a enfermedades y para aumentar la calidad nutricional, sobre todo en aquellas que resuelven problemas actuales a los que se enfrenta la edición genética, como la legislación.

8.1 Resistencia a enfermedades y plagas de insectos

El estrés biótico en las plantas puede ser causado por diversos agentes patógenos como virus, hongos, oomicetos, bacterias, nemátodos y plagas de parásitos e insectos. Estas enfermedades representan una amenaza significativa para la seguridad alimentaria mundial, ya que ocasionan pérdidas que oscilan entre el 20% y el 40% en la producción agrícola (Karmakar *et al.*, 2022). Los plaguicidas químicos reducen estas pérdidas, pero son perjudiciales para el medio, y las prácticas culturales como la rotación de cultivos, no son aplicables en el caso de una tierra cultivable limitada, por lo que la mejora de los cultivos es la mejor opción para controlar las enfermedades (Zhao *et al.*, 2022). Ante esta problemática, la mejora genética de los cultivos se presenta como una opción altamente prometedora para el control de las mismas. Además, las resistencias a las enfermedades provocadas por fitopatógenos, suelen ser monogénicas, lo que juega a favor de una solución basada en edición genética, eliminando o mutando genes de susceptibilidad y desplegando los genes de resistencia (Greenwood *et al.*, 2023).

Aunque sea algo desconocido para mucha gente, las plantas cuentan con un sistema de inmunidad que se basa en un sistema de vigilancia de dos capas (**Fig. 9**). La primera capa se basa en los receptores de reconocimiento de patrón (PRR) en la membrana plasmática, que perciben patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y patrones moleculares asociados a daños (DAMPs), activando la inmunidad desencadenada por patrones (PTI). La segunda capa se basa en receptores intracelulares, entre los que destacan los receptores repetidos ricos en leucina (NLR), que detectan proteínas efectoras y activan una inmunidad desencadenada por efectores (ETI) (Zhao *et al.*, 2022).

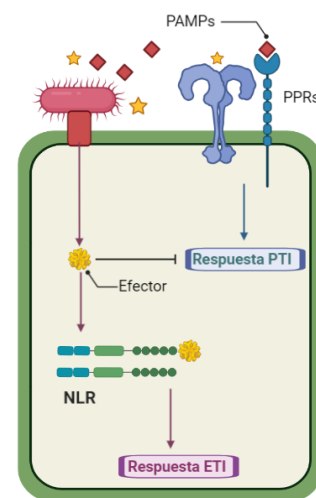


Figura 9. Representación del sistema de inmunidad de las plantas en capas. Imagen creada con Biorender.

Como resultado de la coevolución patógeno-huesped, muchos de los efectores que secretan los patógenos interfieren con el sistema inmune de la planta de diferentes maneras, como por ejemplo, modificando los PAMPs para que no se reconozcan, compitiendo con los PRRs para unirse a los PAMPs, interfiriendo en la síntesis de hormonas de defensa o adquiriendo nuevos efectores. Conocer todos los componentes del sistema inmunitario de las plantas, brinda una

fuentes de genes que pueden utilizarse para la mejora de cultivos, basándose esta en la introducción de genes de resistencia y en la alteración de los genes de susceptibilidad (Zhao *et al.*, 2022).

En el caso de los organismos necrotróficos, que prosperan en el tejido muerto, la defensa utilizada por algunas células de muerte celular programada para que los patógenos no prosperen, no es eficiente. Por ejemplo, *Parastagonospora nodorum* secreta los efectores SnTox1 y SnToxA, reconocidos por el PRR Snn1 y el NLR Tsn1 respectivamente. Al reconocer estos efectores, se produce una muerte celular que favorece al patógeno necrotrófico. En un estudio de Faris *et al.* (2010) se ha conseguido mejorar la resistencia mediante una mutación química de pérdida de función de *Tsn1* (Greenwood *et al.*, 2023).

Los cultivos se enfrentan a constantes amenazas virales, y los virus evolucionan rápidamente para eludir los mecanismos de defensa de las plantas. En este contexto, la tecnología CRISPR ofrece una estrategia prometedora para generar resistencia mediante la manipulación precisa del DNA o RNA viral, así como de los genes de susceptibilidad del huésped (Khan *et al.*, 2022).

Dentro de los virus de DNA que afectan a las plantas, destaca la familia Geminiviridae. Existen muchos estudios en distintas plantas para generar resistencia contra los virus pertenecientes a esta familia, como al virus CLCuMuV del algodón. En este estudio del equipo Yin *et al.* (2019), se introdujo mediante *A. tumefaciens*, una construcción con Cas9 y los dos gRNAs usados para dirigirlos a dos puntos distintos del genoma viral. Esto resultó en la generación de plantas transgénicas de *Nicotiana benthamiana* que mostraron una resistencia completa al virus. Frente al mismo virus y en el mismo tipo de planta que el estudio anterior, el grupo de Khan *et al.* (2020) consiguió una disminución y un retraso de los síntomas en plantas no transgénicas. Además, en un trabajo liderado por de Pramanik *et al.* (2021), se desarrollaron plantas transgénicas de tomate, resistentes al virus de la hoja amarilla en cuchara de tomate, mediante un Knock out del gen de susceptibilidad *SIPelo* (Khan *et al.*, 2022).

Para conferir resistencia a los virus de RNA, además de utilizar Cas9 y sus derivados, se ha usado sobre todo Cas13. Destacan como diana los factores de iniciación de la traducción, como por ejemplo el factor de iniciación de la traducción eucariota 4E (eIF4E), o su isoforma, ya que los virus pueden aprovechar su función en la traducción de proteínas virales (Khan *et al.*, 2022). Entre los virus fitopatógenos de ARN, la familia Potyviridae es notable, y dentro de esta familia destacan los Bymovirus, como el virus del mosaico amarillo de la cebada (BaYMV) y el virus del mosaico leve de la cebada (BaMMV), que pueden ocasionar grandes pérdidas de

rendimiento en los cultivos, llegando hasta un 50%. Estos virus provocan síntomas de mosaicos en las hojas, decoloración y clorosis en el follaje y afectan al crecimiento. Para conferir resistencia a estos virus, se ha utilizado la estrategia de generar polimorfismos en el dominio de unión del eIF4E, lo que impide su interacción con el capuchón del RNA viral que codifica para la proteína viral ligada al genoma (VPg). La traducción de VPg se debe a su semejanza con el mRNA de eucariotas. Esta estrategia evita la traducción de proteínas virales. Sin embargo, muchas cepas de estos virus han logrado superar esta resistencia mediante cambios en la estructura de la VPg. Se ha observado que la desactivación completa del gen de *EIF4E* en cebada confiere resistencia, pero a expensas de una disminución significativa en el rendimiento del cultivo. Además, se ha encontrado un gen de susceptibilidad común a estas dos enfermedades y todas sus cepas, que codifica para la proteína tipo disulfuro isomerasa 5-1 (PDIL5-1), y una mutación en este gen no afecta al rendimiento. Estas proteínas, se encargan de catalizar la formación de puentes de disulfuro en el plegamiento de proteínas en el retículo endoplasmático. Utilizando la técnica de edición genética con Cas9, mediada por *Agrobacterium*, se generaron mutaciones dirigidas en embriones inmaduros de cebada. Luego, se seleccionaron plantas homocigotas mediante PCR y secuenciación de Sanger para garantizar que no hubiera más de una variante alélica presente. Finalmente, se demostró la resistencia de estas plantas mediante la inoculación mecánica del virus (Hoffie *et al.*, 2023).

También, Cheng *et al.* (2022) demostraron la resistencia de cebada al BaYMV y al BaMMV utilizando CRISPR/Cas9 para modificar el gen *PDIL5-1*, lo que generó dos mutantes: *pdil5-1-a* y *pdil5-1-b*. En el caso de *pdil5-1-a*, se codifica una proteína sin residuo de cisteína, mientras que *pdil5-1-b* presenta un cambio en el marco de lectura. Ambos mutantes mostraron resistencia a BaYMV y BaMMV (Cheng *et al.*, 2022).

Las enfermedades fúngicas, como el mildiú polvoriento u oídio, representan una gran amenaza para los cultivos. En el ámbito de la resistencia frente a esta enfermedad, se han utilizado diversas estrategias basadas en CRISPR, por ejemplo, la desactivación del gen *PMR4* en tomate. En este estudio se utilizaron junto con CRISPR/Cas9, cuatro sgRNA dirigidos a este gen, para provocar grandes deleciones. Si bien se logró reducir la susceptibilidad al hongo, no se alcanzó una resistencia completa (**Fig. 10**) (Santillán Martínez *et al.*, 2020). Los genes de la familia *MLO* han demostrado ser factores de susceptibilidad en la presencia del mildiú polvoriento, ya que el hongo los utiliza para promover su proliferación. El equipo de Wan *et al.* (2020) mediante CRISPR/Cas9, indujeron deleciones o inserciones en los genes *VvMLO3* y *VvMLO4* de la vid. Se demostró que la mutación en *VvMLO3*, resultó en una resistencia significativamente mayor

a *Erysiphe necator*. En otro estudio, se realizaron combinaciones de pérdidas de función, en genes pertenecientes a la familia MLO en pepino: *CsaMLO1*, *CsaMLO11* y *CsaMLO8*. Tras investigar la resistencia mediada por MLO en el pepino frente a *Podosphaera xanthii*, causante del mildiú polvoriento, se concluyó que la mutación en los dos primeros genes generaba resistencia en la respuesta post-invasiva, mientras que la mutación en el tercer gen se relacionaba con la respuesta pre-invasiva (Tek *et al.*, 2022).

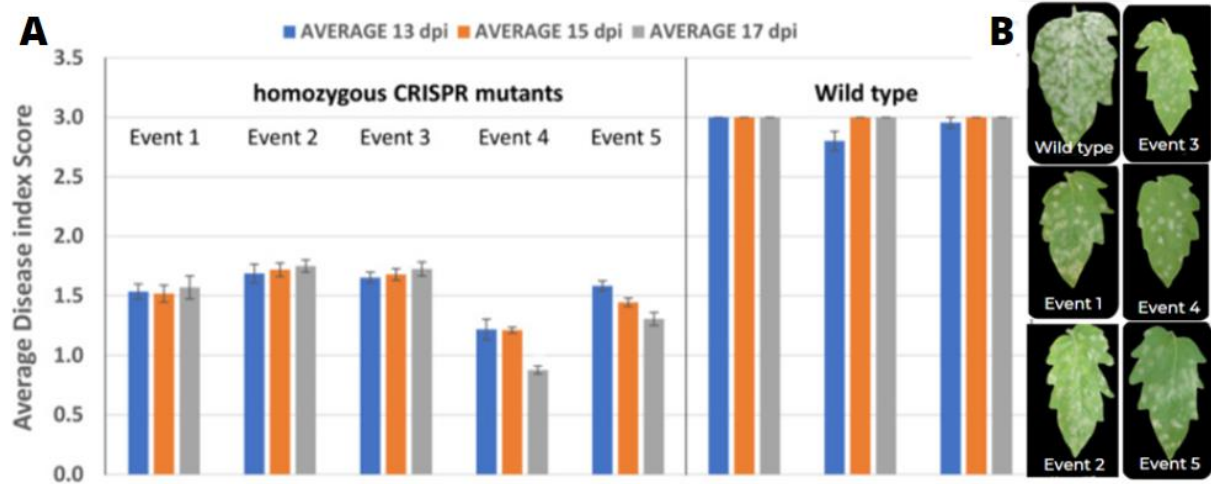


Figura 10. (A) Gráfica de puntuación del índice de la enfermedad tanto en wildtype como en las líneas mutantes 13,15 y 17 días después de la inoculación. (B) Respuesta fenotípica de los 5 mutantes PMR4 y el wildtype, a la infección *Oidium neolycopersici* en las hojas 21 después de la infección. Imagen tomada de (Santillán Martínez *et al.*, 2020)

El genero fúngico *Fusarium*, puede causar enfermedades graves en una gran variedad de cultivos, como cultivos agrícolas, frutales, hortalizas y plantas ornamentales. Una de las enfermedades más perjudiciales es el marchitamiento por *Fusarium* en el tomate, que puede reducir significativamente el rendimiento y la producción. En un estudio reciente, se realizaron mutaciones mediante CRISPR/Cas9 en dos genes de susceptibilidad de esta enfermedad: la proteína 10 de la savia del xilema (XSP10) y la metiltransferasa del ácido salicílico (SAMT). Los resultados mostraron que la mutación simultánea de estos dos genes proporciona una fuerte tolerancia fenotípica a la enfermedad (Debbarma *et al.*, 2023).

Las bacterias representan un desafío significativo para los cultivos, ya que la falta de pesticidas efectivos dificulta el control de enfermedades. Sin embargo, se ha logrado desarrollar plantas de arroz no transgénicas resistentes al tizón bacteriano, mediante CRISPR/Cas12a. Esta mutación dirigida se enfocó en el promotor del gen *Xa13*, donde la proteína efectora bacteriana se une a los nucleótidos 2, 3 y 4 del extremo 5'. Al eliminar una secuencia de 49 pares de bases, que incluía los tres nucleótidos mencionados, se logró proporcionar resistencia al tizón e inhibir la expresión del gen *Xa13*. Este gen codifica una proteína de la membrana plasmática, cuyo

alelo dominante es susceptible a la enfermedad. Para obtener y seleccionar generaciones de plantas resistentes sin la presencia de transgenes, se empleó el método de autoeliminación programada conocido como TKC (“transgene killer CRISPR”), con diana en los gametofitos masculinos. Para ello, en el vector (**Fig.11**) se incluiría un promotor específico de polen y el gen *Zmaal* de la α -amilasa, que interrumpe la acumulación de almidón en la maduración del polen, privándole de la fuente de energía y provocando, por tanto, que las plantas sean estériles. De esta manera, se obstaculiza la transmisión del transgén (Yu *et al.*, 2021).

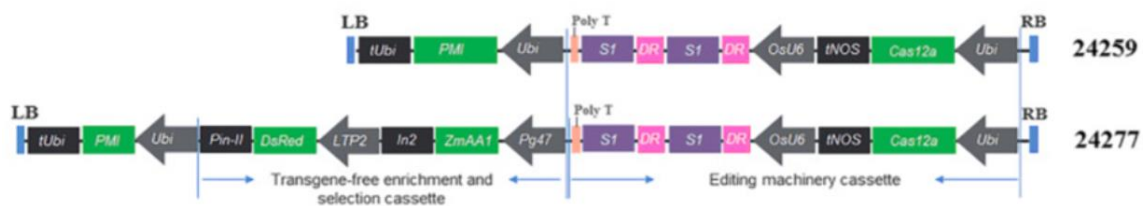


Figura 11. Representación esquemática de la región T-DNA de los vectores 24259 y 24277 (Yu *et al.*, 2021).

El cancro bacteriano de los cítricos tiene un impacto devastador en la producción de cítricos. En un estudio reciente, se logró obtener plantas de *Citrus sinensis* sin transgenes, que eran resistentes al cancro. Para lograr esto, se empleó la tecnología CRISPR/Cas12a para editar el gen de susceptibilidad *CsLOB1*. Se realizó la transformación en protoplastos utilizando el método de electroporación. Como resultado, no se observaron síntomas y el patógeno no pudo crecer (**Fig.12**) (Su *et al.*, 2023).

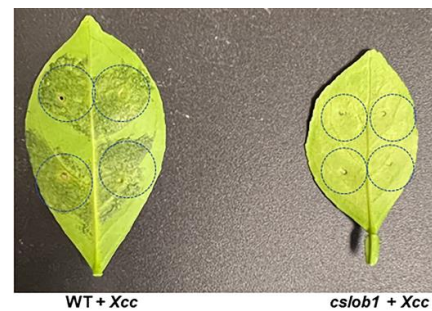


Figura 12. Síntomas del cancro bacteriano de los cítricos en una de hoja de cítrico salvaje y en otra mutante (Su *et al.*, 2023).

Las plagas de insectos no solo causan daños significativos a los cultivos, sino que también actúan como vectores de diversos patógenos, lo que agrava aún más el impacto en la producción. Se estima que alrededor de una sexta parte de la producción de alimentos se pierde debido a las plagas. Actualmente, para controlar estas plagas se utilizan insecticidas organofosforados, pero su uso conlleva efectos negativos, ya que también afectan a los insectos beneficiosos y pueden tener impactos perjudiciales en la salud humana. En este contexto, la tecnología CRISPR ha demostrado ser una herramienta prometedora para desarrollar plantas resistentes a las plagas de insectos. Se han realizado avances en la introducción de genes insecticidas de bacterias, como el gen *cry*. Además, mediante la edición precisa de los genes que controlan la biosíntesis de compuestos volátiles de las plantas, es posible alterar las señales que atraen a los insectos. Por ejemplo, Lu *et al.* (2018) han logrado inactivar el gen *CYP71A1*

utilizando CRISPR/Cas9, el cual codifica una enzima responsable de la biosíntesis de serotonina. Esta modificación genética ha demostrado conferir resistencia al arroz frente a plagas como los saltamontes pardos y los barrenadores del tallo (Karmakar *et al.*, 2022).

8.2 Mejora de la calidad nutricional

La modificación de las vías biosintéticas mediante CRISPR, puede conducir a una adición de valores nutricionales o a una eliminación de elementos perjudiciales, lo que conlleva a una mejora de la calidad nutricional. Existen varios estudios acerca de la delección de genes que codifican para enzimas que catalizan la vía de la síntesis del ácido fítico en el maíz. El ácido fítico está relacionado con problemas con la digestión y el medio ambiente (Chaudhary *et al.*, 2022). Sin duda, CRISPR/Cas9 ha demostrado ser una valiosa herramienta para abordar la presencia de componentes alergénicos en diferentes alimentos. Por ejemplo, Biswas *et al.* (2022) utilizaron esta tecnología para eliminar la proteína alergénica Ara h2 en cacahuetes. Asimismo, se han obtenido cultivos con una menor acumulación de micronutrientes tóxicos, como la reducción del cadmio en el arroz mediante la desactivación del gen transportador de metales *OsNramp5*, empleando CRISPR/Cas9 realizada por el equipo de Songmei *et al.* (2019) (Adeyinka *et al.*, 2023).

El trigo y sus derivados son una fuente alimentaria fundamental a nivel mundial. No obstante, en los últimos años se ha observado un incremento en los trastornos asociados al consumo de trigo, como la celiaquía causada por las proteínas de gluten del mismo. Las α -gliadinas son una de las principales familia de proteínas causantes del desarrollo de esta enfermedad. Se han desarrollado líneas de trigo no transgénicas mediante CRISPR/Cas9 para conseguir un trigo con bajo contenido en gluten. Para lograr este objetivo, se diseñaron dos sgrNAs dirigidos a las regiones conservadas adyacente a la secuencia codificante del epítipo inmunodominante. Se logró reducir la inmunoreactividad un 85% (Sánchez-León *et al.*, 2018).

Otro ejemplo destacado de mejora en la mejora de la calidad nutricional de los cultivos es la obtención de tomates con una mayor producción de ácido γ -aminobutírico (GABA). Los tomates naturalmente poseen un contenido elevado de GABA en comparación con otras frutas y hortalizas. En los humanos, este ácido actúa como uninhibidor de neurotransmisores, disminuye la presión arterial en pacientes hipertensos, reduce el estrés y disminuye el insomnio. Para incrementar los niveles de GABA en los tomates, Nonaka *et al.* (2017) emplearon la técnica CRISPR/Cas9 para introducir un codón de parada prematuro en el gen *GAD3*, el cual está involucrado en la biosíntesis de GABA. Al eliminar la región C-terminal del gen, que contiene un dominio autoinhibidor que limita la producción de GABA, lograron obtener

tomates con niveles de GABA hasta 15 veces superiores a los de los tomates silvestres durante la etapa de madurez. Además, no se observaron efectos negativos en la floración ni en el rendimiento de los tomates modificados (Gramazio *et al.*, 2020).

En los países en desarrollo, es común encontrar deficiencias de micronutrientes, y se estima que el 45% de la mortalidad infantil está relacionada con la desnutrición. Los carotenoides son nutrientes esenciales para los humanos. Mediante la tecnología CRISPR/Cas9, Ibrahim *et al.* (2022) introdujeron un casette de biosíntesis de carotenoides en una región genómica segura del arroz (áreas donde interrumpir el genoma no produce efectos indeseables), produciendo un arroz con una alta concentración en carotenoides, sin presentar efectos indeseables. Además, se ha conseguido aumentar la cantidad de zinc en algunos alimentos, como en el trigo, mediante una disrupción del gen codificante para la enzima inositol pentakisfosfato 2-quinasa 1, reduciendo la cantidad de ácido fítico y aumentando por tanto la cantidad de zinc y hierro (Adeyinka *et al.*, 2023). Unas mil millones de personas sufren déficit en vitamina D que puede conducir a debilitar los huesos, aumentar el riesgo a enfermedades crónicas, reducir la función muscular y aumentar la susceptibilidad a infecciones. La mayor parte de vitamina D se obtiene de fuentes animales, ya que los vegetales son pobres en este nutriente crucial. En las plantas, la vitamina D se transforma en sustancias que regulan el crecimiento, por lo que si se bloquea esta vía para acumular vitamina D se obtendrían plantas atrofiadas. Sin embargo, en las solanáceas existe una ruta paralela que transforma la provitamina D3 en compuestos defensivos. Mediante edición genética se bloqueó esta vía, lo que provocó una acumulación del precursor de la vitamina D sin originar un crecimiento anómalo de la planta; pero hasta que no se cultiven fuera del laboratorio, se desconoce si el bloqueo de producción de estos compuestos defensivos, provocará inconvenientes para manejar el estrés ambiental. La provitamina D3 puede convertirse en vitamina D3 cuando se expone a la luz ultravioleta (Ledford, 2022).

9. REGULACION Y PERSPECTIVAS FUTURAS

El futuro de la tecnología CRISPR depende de establecer un marco regulatorio claro y global para los cultivos. Gracias a CRISPR/Cas se ha entrado en una nueva era de cultivos personalizados. Pero existe un gran debate sobre como regular estos organismos, cuáles serán sus impactos y cómo difieren de los organismos genéticamente modificados (OMG) (Ahmad *et al.*, 2021).

Es importante destacar que existen diferencias entre los transgénicos y los organismos genéticamente modificados. El término OMG se utiliza para referirse a cualquier organismo cuyo material genético ha sido alterado de manera artificial mediante técnicas modernas de ingeniería genética. Por otro lado, los organismos transgénicos se han modificado mediante la introducción de material genético de otra especie. Todos los transgénicos son OMG pero no todos los OMG son transgénicos. La regulación de los OMG se rige bajo el Protocolo de Cartagena sobre la Bioseguridad, el cual se basa en un principio de precaución y tiene como objetivo promover la seguridad en la transferencia, manipulación y uso de los organismos modificados mediante la biotecnología moderna. Este protocolo es parte del Convenio sobre la Diversidad Biológica de las Naciones Unidas que busca conservar la diversidad biológica y promover un uso sostenible de los recursos genéticos (Greenwood *et al.*, 2023).

La tecnología CRISPR goza de una mayor aceptación social y pública en comparación con los cultivos transgénicos, debido a que los organismos editados mediante CRISPR no necesariamente contienen material genético extraño y algunas modificaciones podrían ocurrir de manera natural y por ello no se considerarían organismos genéticamente modificados. Sin embargo, aunque algunos organismos carezcan de transgenes, los oponentes consideran que son cultivos desarrollados por tecnologías de edición genética y por ello las diferencias con los OMG continúan devatiéndose (Ahmad *et al.*, 2021).

Al igual que con los OMG, el panorama regulatorio global de los CRISPR es irregular. Suelen existir dos interpretaciones, una de ellas basada en el proceso utilizado para generar el producto y la otra en la naturaleza del propio producto resultante (**Tabla 2**). En Europa y en Nueva Zelanda los organismos modificados con CRISPR son considerados como OMG y por ello están sometidos a sus regulaciones pese a las protestas de múltiples científicos de que deberían de ser tratados como organismos obtenidos mediante mejora convencional o otras regulaciones específicas (Zhang *et al.*, 2020). Otros países como Estados Unidos, Argentina y Brasil no regulan las plantas editadas con CRISPR sino se pueden distinguir de mutaciones naturales ni si carecen de elementos transgénicos en el producto final (Ahmad *et al.*, 2021).

Tabla 2. Políticas reguladoras para la edición genética vegetal de diferentes países (Zhang *et al.*, 2020).

PAÍS	ORGANISMO	POLÍTICA	CRITERIO
UNIÓN EUROPEA	EFSA	OMG	Proceso utilizado
ESTADOS UNIDOS	USDA- APHIS	No-OMG	Naturaleza del producto
CANADÁ	CFIA	-	Naturaleza del producto
ARGENTINA	CONABIA	No OMG, si el producto final resultó no ser un transgénico; OMG, Si el producto final es transgénico.	Naturaleza del producto
AUSTRALIA	OGTR	No OMG, si el producto final resultó no ser un transgénico; OMG, si el producto final es transgénico.	-

CHINA	-	OMG, si al final el producto es transgénico.	Caso por caso
NUEVA ZELANDA	EPA	OMG	Proceso utilizado
JAPÓN	Ministerio de medio ambiente	No OMG, si el producto final resultó no ser un transgénico; OMG, si el producto final es transgénico.	-
BRASIL	CTNBio	No OMG, si el producto final resultó no ser un transgénico.	Caso por caso
SUECIA	SBA	Exento de OMG, si el DNA extraño no está integrado.	Caso por caso
FRANCIA	HCB	Exento de OMG, si se elimina el gen exógeno; OMG, si el gen exógeno no se elimina.	Naturaleza del producto
CHILE	División de Protección Forestal y Agropecuaria de la SAG	Exento de OMG, si falta una nueva combinación de material genético; OMG, si la nueva combinación del material genético ha ocurrido.	Caso por caso

En este sentido, el pasado 5 de julio la Comisión Europea ha propuesto revisar las normas a cerca de los OMG con el objetivo de flexibilizar las restricciones aplicadas a las plantas obtenidas con la nuevas tecnologías de edición genética entre las que se encuentra CRISPR/Cas9. El objetivo es brindar a los agricultores cultivos más resistentes, reducir el uso de pesticidas químicos y ofrecer alimentos más nutritivos a los consumidores (European Comission, 2023).

La propuesta presenta una clasificación en dos categorías para las plantas generadas mediante nuevas técnicas genómicas (NGT). Las NGT no existían cuando se adoptó la legislación sobre los OMG en la UE en 2001. En la primera categoría se incluirían aquellas plantas que podrían surgir de manera natural o por reproducción convencional, las cuales estarían exentas de la legislación sobre OMG y no requerirían etiquetado, ya que no presentan riesgos nuevos específicos. Sin embargo, se establece un límite de hasta 20 modificaciones genéticas para estas plantas. Por otro lado, las plantas que no cumplan con estas condiciones serán consideradas OMG y estarán sujetas sus evaluaciones y requisitos de aprobación, aunque se propone un proceso más ágil para su aprobación. Por lo tanto, la propuesta solo involucra a organismos obtenidos mediante mutagénesis dirigida y cisgénesis. La mutagénesis, implica mutaciones en el genoma sin la inserción de material genético extraño, y la cisgénesis, que implica la inserción de material genético de un organismo compatible sexualmente. Sin embargo, no se incluyen los vegetales obtenidos mediante técnicas de transgénesis, donde se introduce material genético de una especie no compatible (European Comission, 2023).

La propuesta legislativa se basó en consultas a organismos científicos y en la evaluación de investigaciones científicas, incluyendo la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y el Centro Común de Investigación (JRC). Para que la propuesta entre en vigencia, debe ser aprobada tanto por el Parlamento Europeo como por los gobiernos de los países de la Unión Europea. La propuesta ha recibido respaldo de empresas biotecnológicas, como Bayer. Sin

embargo, también ha generado críticas por parte de activistas y otros grupos que se oponen a la flexibilización de las normas (European Commission, 2023).

En resumen, existen dos perspectivas futuras acerca de la regulación de organismos modificados mediante CRISPR/Cas9 en la Unión Europea. La primera de ellas, que ofrece el futuro más prometedor, con la aprobación de la propuesta legislativa anterior. El segundo futuro posible es un futuro por defecto y las plantas editadas mediante CRISPR se enfrentarían a una legislación cuyos cimientos datan del 1990. En este caso, las plantas seguirían estando legisladas bajo las leyes de los OMG. La petición legislativa no tendría éxito y se les aplicaría el mismo estatus que a las plantas transgénicas, sin importar el método que se utilice para obtenerlas. Este escenario sería una consecuencia desafortunada de la falta de consenso entre los Estados miembros y la incapacidad de adoptar una nueva legislación específica (Escajedo San-Epifanio *et al.*, 2023).

La flexibilización de las reglas para los organismos editados con CRISPR permitiría aprovechar plenamente el potencial de esta tecnología en la mejora de cultivos y la producción de alimentos más sostenibles. Al eliminar restricciones innecesarias, se facilitaría la investigación y la implementación de mejoras genéticas en los cultivos, acelerando el desarrollo de variedades resistentes y nutritivas. Esto fomentaría la innovación y la competitividad en el sector agrícola, generando beneficios económicos y sociales a largo plazo. Es importante destacar que CRISPR no implica los mismos riesgos que los cultivos transgénicos tradicionales ya que en algunos casos no implica la introducción de genes de especies diferentes, sino que se basa en la modificación precisa de los genes existentes y, por lo tanto, no debería estar sujeto a una regulación tan estricta. En resumen, una mayor flexibilización en las reglas promovería la seguridad alimentaria, la sostenibilidad agrícola y la salud humana a través de la aplicación de esta tecnología.

10. CONCLUSIONES

En este Trabajo Fin de Grado se ha adquirido un profundo entendimiento de los componentes y mecanismos de la tecnología de edición génica en plantas CRISPR/Cas. Las conclusiones a las que se ha llegado son las siguientes:

- 1- La tecnología CRISPR/Cas supone una revolución tecnológica en cuanto a la mejora genética vegetal. Sin embargo, el principal cuello de botella es la entrega del material de edición a las células vegetales, especialmente en estrategias HDR.

- 2- La revisión exhaustiva de artículos científicos recientes, ha desmostrado la eficiencia del uso de CRISPR, para generar plantas resistentes a estrés biótico y con un mayor valor nutricional. Estas plantas modificadas permiten aumentar la producción agrícola en una misma superficie y reducir los costes asociados.
- 3- La legislación vigente en la Unión Europea y en otros países sobre el uso de OMGs vegetales obtenidos mediante nuevas tecnologías, incluyendo CRISPR/Cas, ha revelado la dificultad de la aplicación fuera del laboratorio de las mismas. Sin embargo, en los últimos días ha surgido una nueva propuesta que excluye de la legislación de OMGs, a aquellos que podrían surgir de manera natural o por reproducción convencional.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Adeyinka, O. S., Tabassum, B., Koloko, B. L. y Ogunjibe, I. V. (2023) "Enhancing the quality of staple food crops through CRISPR/Cas-mediated site-directed mutagenesis", *Planta*, 257(4). doi:10.1007/s00425-023-04110-6.
- Ahmad, A., Munawar, N., Khan, Z., Qusmani, A. T. *et al.* (2021) "An outlook on global regulatory landscape for genome-edited crops", *International Journal of Molecular Sciences*. doi:10.3390/ijms222111753.
- Alok, A., Sandhya, D., Jogam, P., Rodrigues, V. *et al.* (2020) "The Rise of the CRISPR/Cpf1 System for Efficient Genome Editing in Plants", *Frontiers in Plant Science*. doi:10.3389/fpls.2020.00264.
- Asociación de Biotecnología Vegetal Agrícola (2020) *Aumenta el número de países que siembran cultivos transgénicos*. Disponible en: <https://agrobio.org/noticias/aumenta-el-numero-de-paises-que-siembran-cultivos-transgenicos> (Accedido en: 23 de abril de 2023).
- Bailey-Serres, J., Parker, J. E., Ainsworth, E. A., Oldroyd, G. E. D. *et al.* (2019) "Genetic strategies for improving crop yields", *Nature*, pp. 109–118. doi:10.1038/s41586-019-1679-0.
- Bandurska, K., Berdowska, A. y Król, M. (2016) "Transformation of medicinal plants using *Agrobacterium tumefaciens*", *Postepy Hig Med Dosw (online)*. doi: 10.5604/17322693.1226660.
- Biswas, S., Wahl, N. J., Thomson, M. J., Cason, J. M. *et al.* (2022). "Optimization of Protoplast Isolation and Transformation for a Pilot Study of Genome Editing in Peanut by Targeting the Allergen Gene Ara h 2", *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2). doi: 10.3390/ijms23020837.
- Beunza González I. (2019) *CRISPR COMO HERRAMIENTA DE EDICIÓN GENÉTICA Y SUS APLICACIONES EN LA SALUD HUMANA*. Trabajo Fin de Grado. Universidad Complutense de Madrid.
- Cecon, E. (2008) "La revolución verde tragedia en dos actos", *Redalyc*, 1(91), pp. 21-29.
- Chaudhary, J., Deshmukh, R. y Sonah, H. (2019) "Mutagenesis approaches and their role in crop improvement", *Plants*. doi:10.3390/plants8110467.
- Chaudhary, M., Mukherjee, T. K., Singh, R., Gupta, M. *et al.* (2022) "CRISPR/Cas technology for improving nutritional values in the agricultural sector: an update", *Molecular Biology Reports*, 49(7), pp. 7101–7110. doi:10.1007/s11033-022-07523-w.
- Cheng, C., Kan, J., Li, S., Jiang, C. *et al.* (2022) "Mutation of barley HvPDIL5-1 improves resistance to yellow mosaic virus disease without growth or yield penalties", *Frontiers in Plant Science*. doi:10.3389/fpls.2022.1018379.
- Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología (2023) *Los cultivos transgénicos en el mundo*. Disponible en: <https://www.argenbio.org/cultivos-transgenicos/12549-los-cultivos-transgenicos-en-el-mundo> (Accedido en: 23 de abril de 2023).
- Cueva Garcés, E. O. (2019) *Estudio de la adaptación nativa en el sistema CRISPR de Salmonella enterica serovar Typhimurium*. Trabajo de Fin de Máster. Universidad de Alicante.
- Debbarma, J., Saikia, B., Singha, D. L., Das, D. *et al.* (2023) "CRISPR/Cas9-Mediated Mutation in XSP10 and SISAMT Genes Impart Genetic Tolerance to Fusarium Wilt Disease of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.)", *Genes*, 14(2). doi:10.3390/genes14020488.
- Escajedo San-Epifanio, L., Filibi, I., Lasa López, A., Puigdomènech, P. y Uncetabarrenechea Larrabe, J. (2023) "Possible EU futures for CRISPR-edited plants: Little margin for optimism?", *Frontiers in Plant Science*. doi:10.3389/fpls.2023.1141455.

- European Commission (2023) *Nuevas técnicas en biotecnología*. Disponible en: https://food.ec.europa.eu/plants/genetically-modified-organisms/new-techniques-biotechnology_en#commission-proposal-on-plants-obtained-by-certain-new-genomic-techniques (Accedido en: 10 de julio de 2023).
- Faris, J. D., Zhang, Z., Lu, H., Lu, S. *et al.* (2010) "A unique wheat disease resistance-like gene governs effector-triggered susceptibility to necrotrophic pathogens", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(30), pp. 13544–13549. doi:10.1073/pnas.1004090107 .
- Fernández Donas, C. (2022) *Optimización de protocolos de transformación vegetal en plantas modelo para la aplicación de la tecnología Crispr/Cas*. Trabajo Fin de Grado. Universidad Politécnica de Cartagena.
- Gao, C. (2021) "Genome engineering for crop improvement and future agriculture", *Cell*, pp. 1621–1635. doi:10.1016/j.cell.2021.01.005.
- Giraldo, P. A., Shinozuka, H., Spangenberg, G. C., Cogan, N. O. I. y Smith, K. F. (2019) "Safety Assessment of Genetically Modified Feed: Is There Any Difference From Food?", *Frontiers in Plant Science*. doi:10.3389/fpls.2019.01592.
- Gostimskaya, I. (2022) "CRISPR–Cas9: A History of Its Discovery and Ethical Considerations of Its Use in Genome Editing", *Biochemistry (Moscow)*, pp. 777–788. doi:10.1134/S0006297922080090.
- Gómez, M. (2021) "Crecimiento de la población y la degradación ambiental en México y el mundo", *Revista Nicolaita de Estudios Económicos*, 16 (2), pp. 91-95.
- Gramazio, P., Takayama, M. y Ezura, H. (2020) "Challenges and Prospects of New Plant Breeding Techniques for GABA Improvement in Crops: Tomato as an Example", *Frontiers in Plant Science*. doi:10.3389/fpls.2020.577980.
- Greenwood, J. R., Zhang, X. y Rathjen, J. P. (2023) "Precision genome editing of crops for improved disease resistance", *Current Biology*, pp. R650–R657. doi:10.1016/j.cub.2023.04.058.
- Hamdan, M. F., Noor, S. N. M., Abd-Aziz, N., Pua, T. L. y Tan, B. C. (2022) "Green Revolution to Gene Revolution: Technological Advances in Agriculture to Feed the World", *Plants*. doi:10.3390/plants11101297.
- He, Y., Wang, R., Dai, X. y Zhao, Y. (2017) "On Improving CRISPR for Editing Plant Genes: Ribozyme-Mediated Guide RNA Production and Fluorescence-Based Technology for Isolating Transgene-Free Mutants Generated by CRISPR", *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, pp. 151–166. doi:10.1016/bs.pmbts.2017.03.012.
- HOFFIE, R. E., Perovic, D., Habekuß, A., Ordon, F. y Kumlehn, J. (2023) "Novel resistance to the Bymovirus BaMMV established by targeted mutagenesis of the PDIL5-1 susceptibility gene in barley", *Plant Biotechnology Journal*, 21(2), pp. 331–341. doi:10.1111/pbi.13948.
- Impens, L., Jacobs, T. B., Nelissen, H., Inzé, D. y Pauwels, L. (2022) "Mini-Review: Transgenerational CRISPR/Cas9 Gene Editing in Plants", *Frontiers in Genome Editing*. doi:10.3389/fgeed.2022.825042.
- Ishino, Y., Krupovic, M. y Forterre, P. (2018) "History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology", *Journal of Bacteriology*, 200(7). doi:10.1128/JB.00580-17.
- Jaganathan, D., Ramasamy, K., Sellamuthu, G., Jayabalan, S. y Venkataraman, G. (2018) "CRISPR for crop improvement: An update review", *Frontiers in Plant Science*. doi:10.3389/fpls.2018.00985.
- Jiménez, S., Fattahi, M., Bedis, K., Nasrolahpour-moghadam, S. *et al.* (2020) "Interactional Effects of Climate Change Factors on the Water Status, Photosynthetic Rate, and Metabolic Regulation in Peach", *Frontiers in Plant Science*. doi:10.3389/fpls.2020.00043.
- Jouve de la Barreda, N. (2020) "De la transgénesis a la edición génica. Aplicaciones y consideraciones bioéticas", *Cuadernos de bioética : revista oficial de la Asociación Española de Bioética y Ética Médica*, 31(103), pp. 387–401. doi:10.30444/CB.78.
- Kantor, A., McClements, M. E. y Maclaren, R. E. (2020) "Crispr-cas9 dna base-editing and prime-editing", *International Journal of Molecular Sciences*, pp. 1–22. doi:10.3390/ijms21176240.
- Karlson, C. K. S., Mohd-noor, S. N., Nolte, N. y Tan, B. C. (2021) "Crispr/dcas9-based systems: Mechanisms and applications in plant sciences", *Plants*. doi:10.3390/plants10102055.
- Karmakar, S., Das, P., Panda, D., Xie, K. *et al.* (2022) "A detailed landscape of CRISPR-Cas-mediated plant disease and pest management", *Plant Science*. doi:10.1016/j.plantsci.2022.111376.
- Kavuri, N. R., Ramasamy, M., Qi, Y. y Mandadi, K. (2022) "Applications of CRISPR/Cas13-Based RNA Editing in Plants", *Cells*. doi:10.3390/cells11172665.
- Khan, S., Mahmood, M. S., Ur Rahman, S., Rizvi, F. y Ahmad, A. (2020). "Evaluation of the CRISPR/Cas9 system for the development of resistance against Cotton leaf curl virus in model plants", *Plant Protection Science*, 56(3), pp. 154–162. doi: <https://doi.org/10.17221/105/2019-PPS>.

- Khan, Z. A., Kumar, R. y Dasgupta, I. (2022) "CRISPR/Cas-Mediated Resistance against Viruses in Plants", *International Journal of Molecular Sciences*. doi:10.3390/ijms23042303.
- Laforest, L. C. y Nadakuduti, S. S. (2022) "Advances in Delivery Mechanisms of CRISPR Gene-Editing Reagents in Plants", *Frontiers in Genome Editing*. doi:10.3389/fgeed.2022.830178.
- Leal, A. F., Cifuentes, J., Quezada, V., Benincore-Flórez, E. *et al.* (2022) "CRISPR/nCas9-Based Genome Editing on GM2 Gangliosidoses Fibroblasts via Non-Viral Vectors", *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18). doi:10.3390/ijms231810672.
- Ledford, H. (2022) "Los tomates modificados genéticamente podrían proporcionar una nueva fuente de vitamina D", *Nature*. doi: 10.1038/d41586-022-01443-2.
- Leonova, E. I. y Gainetdinov, R. R. (2020) "CRISPR/Cas9 technology in translational biomedicine", *Cellular Physiology and Biochemistry*, pp. 354–370. doi:10.33594/000000224.
- Li, C., Brant, E., Budak, H. y Zhang, B. (2021) "CRISPR/Cas: a Nobel Prize award-winning precise genome editing technology for gene therapy and crop improvement", *Journal of Zhejiang University: Science B*, pp. 253–284. doi:10.1631/jzus.B2100009.
- Liu, G., Lin, Q., Jin, S. y Gao, C. (2022) "The CRISPR-Cas toolbox and gene editing technologies", *Molecular Cell*, pp. 333–347. doi:10.1016/j.molcel.2021.12.002.
- Liu, Q., Yang, F., Zhang, J., Liu, H. *et al.* (2021) "Application of crispr/cas9 in crop quality improvement", *International Journal of Molecular Sciences*. doi:10.3390/ijms22084206.
- Liu, Z., Dong, H., Cui, Y., Cong, L. y Zhang, D. (2020) "Application of different types of CRISPR/Cas-based systems in bacteria", *Microbial Cell Factories*. doi:10.1186/s12934-020-01431-z.
- Long, Y., Yang, Y., Pan, G. y Shen, Y. (2022) "New Insights Into Tissue Culture Plant-Regeneration Mechanisms", *Frontiers in Plant Science*. doi:10.3389/fpls.2022.926752.
- Lu, H. P., Luo, T., Fu, H. W., Wang, L. *et al.* (2018). "Resistance of rice to insect pests mediated by suppression of serotonin biosynthesis" *Nature Plants*, 4(6), pp. 338–344. doi:10.1038/s41477-018-0152-7.
- Mengstie, M. A. y Wondimu, B. Z. (2021) "Mechanism and applications of crispr/ cas-9-mediated genome editing", *Biologics: Targets and Therapy*, pp. 353–361. doi:10.2147/BTT.S326422.
- Nonaka, S., Arai, C., Takayama, M., Matsukura, C. y Ezura, H. (2017) "Efficient increase of Γ -aminobutyric acid (GABA) content in tomato fruits by targeted mutagenesis", *Scientific Reports*, 7(1). doi: 10.1038/s41598-017-06400-y
- Pardo Piñón, M. (2017) *Overview of the CRISPR-Cas system and design of sgRNAs (single guide RNAs) for genomic DNA editing in yeast*. Trabajo de Fin de grado. Universidad de La Coruña.
- Pedraza Olivera, R. M. (2013) *Seguridad y soberanía alimentaria. Revoluciones verdes y agricultura sostenible*. Apuntes para un libro de texto de Práctica Agrícola II. Universidad de Camagüey.
- Pingali, P. L. (2012) "Green revolution: Impacts, limits, and the path ahead", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, pp. 12302–12308. doi:10.1073/pnas.0912953109.
- Pramanik, D., Shelake, R. M., Park, J., Kim, M. J. *et al.* (2021) "CRISPR/Cas9-mediated generation of pathogen-resistant tomato against tomato yellow leaf curl virus and powdery mildew", *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), pp. 1–18. doi: 10.3390/ijms22041878
- Riveros-Maidana, R., Méndez-Ferreira, A., Benítez-Candia, N., Nara-Pereira, E. y Fernández-Ríos, D. (2020) "Sistema CRISPR/Cas: Edición genómica de precisión", *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 18(1), pp. 97–107. doi:10.18004/mem.iics/1812-9528/2020.018.01.97-107.
- Sánchez-León, S., Gil-Humanes, J., Ozuna, C. V., Giménez, M. J. *et al.* (2018) "Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9", *Plant Biotechnology Journal*, 16(4), pp. 902–910. doi:10.1111/pbi.12837.
- Sandhya, D., Jogam, P., Allini, V. R., Abbagani, S. y Alok, A. (2020) "The present and potential future methods for delivering CRISPR/Cas9 components in plants", *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. doi:10.1186/s43141-020-00036-8.
- Santillán Martínez, M. I., Bracuto, V., Koseoglou, E., Appiano, M. *et al.* (2020) "CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the tomato susceptibility gene PMR4 for resistance against powdery mildew", *BMC Plant Biology*, 20(1). doi:10.1186/s12870-020-02497-y.
- Servicio Internacional para la Adquisición de Aplicaciones de Agrobiotecnología (ISAAA) (2023) *Países con aprobaciones de cultivos transgénicos*. Disponible en: <https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/countrylist/default.asp> (Accedido en: 23 de abril de 2023).
- Shih, S.-Y., Mortensen, U. H., Chang, F.-R. y Tsai, H. (2022) "Editing *Aspergillus terreus* using the CRISPR-Cas9 system", *Synthetic Biology*, 7 (1), pp. 1-8.

- Songmei, L., Jie, J., Yang, L., Jun, M. *et al.* (2019) "Characterization and Evaluation of OsLCT1 and OsNramp5 Mutants Generated Through CRISPR/Cas9-Mediated Mutagenesis for Breeding Low Cd Rice", *Rice Science*, 26(2), pp. 88–97. doi:10.1016/j.rsci.2019.01.002
- Su, H., Wang, Y., Xu, J., Omar, A. A. *et al.* (2023) "Generation of the transgene-free canker-resistant *Citrus sinensis* using Cas12a/crRNA ribonucleoprotein in the T0 generation", *Nature Communications*, 14(1), p. 3957. doi:10.1038/s41467-023-39714-9.
- Tek, M. I., Calis, O., Fidan, H., Shah, M. D. *et al.* (2022) "CRISPR/Cas9 based mlo-mediated resistance against *Podosphaera xanthii* in cucumber (*Cucumis sativus* L.)", *Frontiers in Plant Science*. doi:10.3389/fpls.2022.1081506.
- Turnbull, C., Lillemo, M. y Hvoslef-Eide, T. A. K. (2021) "Global Regulation of Genetically Modified Crops Amid the Gene Edited Crop Boom", *Frontiers in Plant Science*. Frontiers. doi:10.3389/fpls.2021.630396.
- Vicente Valor, J. (2018) *CRISPR: DE VERDUGO A CIRUJANO DEL GENOMA*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Complutense de Madrid.
- Wan, D. Y., Guo, Y., Cheng, Y., Hu, Y. *et al.* (2020) "CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of VvMLO3 results in enhanced resistance to powdery mildew in grapevine (*Vitis vinifera*)", *Horticulture Research*, 7(1). doi: 10.1038/s41438-020-0339-8
- Westermann, L., Neubauer, B. y Köttgen, M. (2021) "Nobel Prize 2020 in Chemistry honors CRISPR: a tool for rewriting the code of life", *European Journal of Physiology*. doi:10.1007/s00424-020-02497-9/Published.
- Xiong, X., Chen, M., Lim, W. A., Zhao, D. y Qi, L. S. (2016) "CRISPR/Cas9 for Human Genome Engineering and Disease Research", *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. doi:10.1146/annurev-genom-083115-022258.
- Xue, C. y Greene, E. C. (2021) "DNA Repair Pathway Choices in CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing", *Trends in Genetics*, pp. 639–656. doi:10.1016/j.tig.2021.02.008.
- Yang, L., Tang, J., Ma, X., Lin, Y. *et al.* (2021) "Progression and application of CRISPR-Cas genomic editors", *Methods*, pp. 65–74. doi:10.1016/j.ymeth.2021.03.013.
- Yang, Y., Xu, C., Shen, Z. y Yan, C. (2022) "Crop Quality Improvement Through Genome Editing Strategy", *Frontiers in Genome Editing*. doi:10.3389/fgeed.2021.819687.
- Yin, K., Han, T., Xie, K., Zhao, J. *et al.* (2019) "Engineer complete resistance to Cotton Leaf Curl Multan virus by the CRISPR/Cas9 system in *Nicotiana benthamiana*", *Phytopathology Research*. doi:10.1186/s42483-019-0017-7
- Young, J. K., Gasiior, S. L., Jones, S., Wang, L. *et al.* (2019) "The repurposing of type I-E CRISPR-Cascade for gene activation in plants", *Communications Biology*. doi:10.1038/s42003-019-0637-6.
- Yu, K., Liu, Z., Gui, H., Geng, L. *et al.* (2021) "Highly efficient generation of bacterial leaf blight-resistant and transgene-free rice using a genome editing and multiplexed selection system", *BMC Plant Biology*, 21(1). doi:10.1186/s12870-021-02979-7.
- Zhang, D., Hussain, A., Manghwar, H., Xie, K. *et al.* (2020) "Genome editing with the CRISPR-Cas system: an art, ethics and global regulatory perspective", *Plant Biotechnology Journal*, pp. 1651–1669. doi:10.1111/pbi.13383.
- Zhang, D., Zhang, Z., Unver, T. y Zhang, B. (2021) "CRISPR/Cas: A powerful tool for gene function study and crop improvement", *Journal of Advanced Research*, pp. 207–221. doi:10.1016/j.jare.2020.10.003.
- Zhao, Y., Zhu, X., Chen, X. y Zhou, J. M. (2022) "From plant immunity to crop disease resistance", *Journal of Genetics and Genomics*, pp. 693–703. doi:10.1016/j.jgg.2022.06.003.
- Zhou, Y., Bravo, J. P. K., Taylor, H. N., Steens, J. A. *et al.* (2021) "Structure of a type IV CRISPR-Cas ribonucleoprotein complex", *iScience*, 24(3). doi:10.1016/j.isci.2021.102201.