



universidad
de león



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**CÓMO ACELERAR EL PROCESO DE
DOMESTICACIÓN EN PLANTAS MEDIANTE
TÉCNICAS DE EDICIÓN GENÉTICA**

**HOW TO ACCELERATE THE DOMESTICATION
PROCESS IN PLANTS USING GENE EDITING
TECHNIQUES**

Autor: Marta Fernández Cuervo

Tutor: Pedro García García

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Septiembre, 2023

Índice

1. Introducción.....	1
2. Objetivos	5
3. Materiales y métodos	5
4. Domesticación de <i>novo</i>	6
4.1. Domesticación de <i>novo</i> : ingeniería genética.....	7
4.2. Domesticación de cultivos huérfanos.....	10
5. <i>Speed breeding</i>.....	11
5.1. Estrategias para acelerar el proceso de cultivo.....	13
6. Edición genética.....	16
6.1. Estrategias de domesticación mediante ZFN	17
6.2. Estrategias de domesticación mediante TALEN	18
6.3. CRISPR-Cas9.....	19
7. Conclusión y perspectivas futuras	23
8. Referencias	25

RESUMEN

La domesticación de plantas es un proceso que se ha llevado a cabo por el hombre desde la existencia del sedentarismo. Desde hace miles de años, los hombres han cultivado las plantas que se encontraban en la naturaleza con el objetivo de obtener plantas con características mejores que aportasen un beneficio para su comunidad. En las últimas décadas, con el aumento descontrolado de la población y la limitación de recursos como consecuencia de la crisis climática, la necesidad de cambiar la manera de obtener cultivos rentables es inminente. La aparición de la domesticación de *novo* y el desarrollo de las tecnologías de ingeniería genética ofrecen nuevas alternativas a los métodos de cultivo convencionales. El objetivo de este Trabajo de Fin de Grado es estudiar las diferentes estrategias que ofrecen un nuevo enfoque para acelerar el proceso de domesticación de plantas silvestres y obtener cultivos más rentables en un menor intervalo de tiempo, desde la manipulación de las condiciones ambientales hasta la edición del genoma mediante CRISPR-Cas, pudiendo desarrollar no solo nuevos cultivos hasta ahora sin explotar, como es el caso de los cultivos huérfanos, sino también nuevas estrategias de domesticación desde cero de especies ya cultivadas, acortando los tiempos de generación en más de la mitad. Sin embargo, la aprobación pública sigue siendo un obstáculo para el completo desarrollo de estas tecnologías.

Palabras clave: CRISPR-Cas, cultivos huérfanos, domesticación de *novo*, edición génica, mejora rápida, QTLs.

ABSTRACT

Plant domestication is a process that has been carried out by men since the existence of sedentarism. For thousands of years, humans have been cultivating plants found in nature with the aim of obtaining plants with better characteristics that would provide a benefit to their community. In recent decades, with the uncontrolled increase in population and the limitation of resources because of the climate crisis, the need to change the way of obtaining profitable crops is imminent. The emergence of *de novo* domestication and the development of genetic engineering technologies offer new alternatives to conventional breeding methods. The aim of this Final Degree Project is to study the different strategies that offer a new approach to accelerate the domestication process of wild plants and obtain more profitable crops in a shorter period of time, from the manipulation of environmental conditions to genome editing using CRISPR-Cas, being able to develop not only new crops so far unexploited, as is the case of orphan crops, but also new strategies for domestication from scratch of already cultivated species, shortening generation times by more than half. However, public approval remains an obstacle to the full development of these technologies.

Key words: CRISPR-Cas, orphan crops, *de novo* domestication, gene editing, speed breeding, QTLs.

1. Introducción

La población mundial está en continuo crecimiento, aumentando el número de personas exponencialmente hasta el punto en que se prevé alcanzar los 10 000 millones en 2050. A raíz de este problema se plantea un objetivo importante: la necesidad de aumentar la producción de los cultivos de alimentos al menos un 60 % para poder abastecer a la población (Yadav *et al.*, 2023). A este problema se le suma la disminución de diversidad genética como consecuencia de la selección intensiva y monocultivo de las plantas (Yu y Li, 2022) y la escasez de recursos naturales cada vez más agravada.

La domesticación de plantas es un proceso de selección artificial cuyo objetivo es crear una nueva forma de planta modificada partiendo de una especie silvestre, que presente características beneficiosas para las personas (Doebley *et al.*, 2006). Esta selección también ocurre en la naturaleza, independientemente de los humanos, por ejemplo, cuando una planta no es capaz de superar las condiciones ambientales a las que queda sometida. Al conjunto de rasgos comunes que diferencian a las plantas domesticadas de sus silvestres en la mayoría de los cultivos se les conoce con el nombre de “**síndrome de domesticación**” (Figura 1) (Doebley *et al.*, 2006).

Estos rasgos son consecuencia de la selección sistemática por parte del hombre, que a menudo genera demandas similares en los cultivos con el objetivo de maximizar el rendimiento. De este modo, la mayoría de las plantas cultivadas presentan, por ejemplo, los frutos o granos más grandes que en su pariente silvestre y en menor número, pérdida de la dispersión natural de sus semillas (lo cual facilita la recolección por parte del hombre) o son plantas más robustas como resultado del crecimiento determinado que prioriza la dominancia apical (el crecimiento de los tallos laterales disminuye) (Lenser y Theißen, 2013). También se aprecian cambios fisiológicos, como la pérdida de latencia de las semillas o la disminución de amargura en las estructuras comestibles (Doebley *et al.*, 2006).

Una parte de estos cambios fenotípicos, a pesar de depender de cambios genéticos, son inducidos por el contexto ambiental. Esto quiere decir que, algunas especies, cuando se dejan crecer de nuevo en la naturaleza, pueden recuperar fácilmente su fenotipo silvestre (Denham *et al.*, 2020). Este es el caso de cultivos como la zanahoria o la lechuga, que no se han modificado drásticamente y, en condiciones salvajes, son capaces de revertir a su forma silvestre o convertirse en malas hierbas (Doebley *et al.*, 2006).

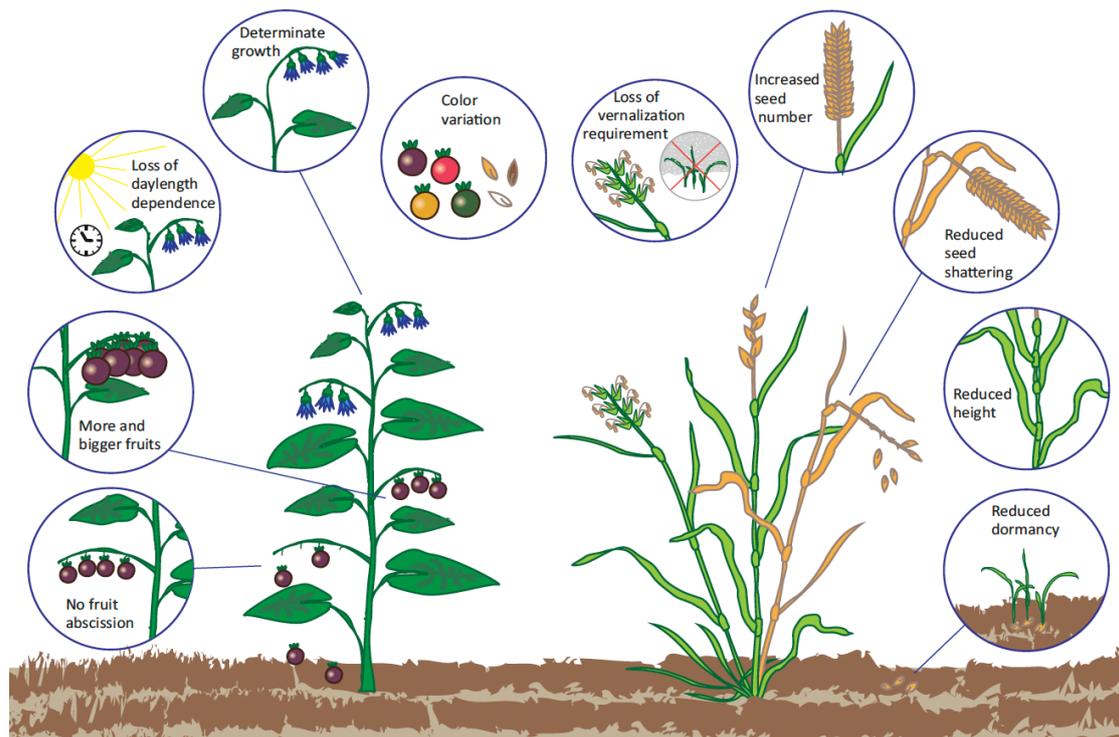


Figura 1. Ejemplos de rasgos fenotípicos que forman parte del síndrome de domesticación. (Lenser y Theißen, 2013).

Hace diez mil años, los seres humanos dejaron el modelo de vida nómada para empezar a criar animales y cultivar y recolectar sus propias cosechas, de este modo, durante miles de años los pueblos han seleccionado los cultivos más prometedores para explotar estas plantas en su propio beneficio. Gracias a este proceso, cientos de plantas silvestres se convirtieron en cultivos domesticados, incluidos los cultivos más productivos de la actualidad: trigo, maíz y arroz (Doebley *et al.*, 2006).

De esta manera, intuitivamente, los primeros agricultores seleccionaban aquellas plantas que destacaban por sus características beneficiosas (por ejemplo, un mayor rendimiento de sus cultivos o un fruto más grande), las protegían y repetían este proceso con sus descendientes.

Este proceso se repitió durante años, resultando en la acumulación de mutaciones beneficiosas que confirieron a las especies características mejoradas. Algunos de estos cambios aleatorios en el genoma se han asociado a los procesos de domesticación, surgiendo un nuevo concepto: genes de domesticación; los cuales fueron definidos por Østerberg *et al.* (2017) como aquellos que tienen un efecto notable en el fenotipo asociado a la mejora de la especie, teniendo un papel importante en el proceso de domesticación. Este proceso debe adaptarse a la especie que se cultiva, siendo complicado en algunas especies la delimitación de la domesticación. Fundamentalmente se pueden llevar a cabo

dos rutas de especiación de una planta, como ocurrió en la familia *Brassicaceae* (Figura 2): la selección del desarrollo de una parte de la planta o el desarrollo de aloploidía mediante la hibridación con otra especie (Ferne y Yan, 2019).

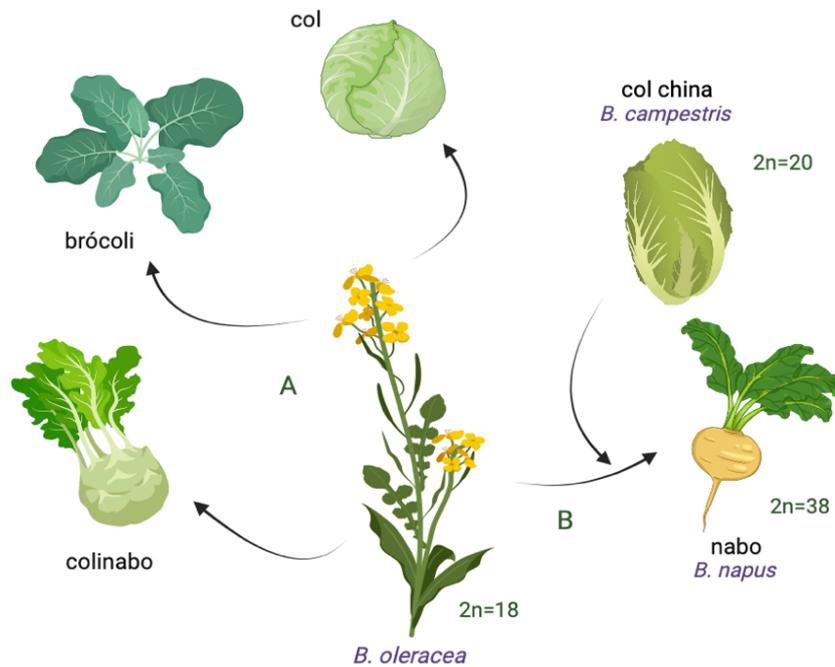


Figura 2. Esquema de la domesticación de la familia *Brassicaceae* a partir de *B. oleracea*; mediante: selección (A) de flores (brócoli), de yemas terminales (col) y de tallo (colinabo); y aloploidía (B), donde la hibridación con la col china (*B. campestris*) resulta en el nabo (*B. napus*). Figura creada con *Biorender*, basada en Ferne y Yan (2019).

Una vez seleccionados aquellos ejemplares que tienen propiedades ventajosas para su explotación, se procede a su mejora, de manera que se obtienen variedades llamadas “élite”, procedentes de esas especies autóctonas primitivas (Yu y Li, 2022), que se explotan como monocultivo.

A mediados del siglo XX los objetivos del fitomejoramiento cambiaron y se tuvieron que adaptar a las nuevas tecnologías agrícolas: nuevos sistemas de riego, maquinaria especializada o el uso de fertilizantes y pesticidas. Por estas razones ocurrió la primera Revolución Verde (Figura 3), que actualizó el sistema agrícola mundial y creó nuevas variedades de trigo y arroz semienanas capaces de resistir los fertilizantes y con mayor rendimiento de cosecha. Esta revolución aumentó la producción agrícola un 250 % a nivel mundial (Yu y Li, 2022) y dio comienzo a la agricultura de alta intensidad. Sin embargo, este modelo de alto rendimiento también tiene un alto consumo de energía.

Esta agricultura intensiva plantea varios problemas a largo plazo, como el agotamiento de los recursos y la pérdida de diversidad de las especies cultivadas, además de que los cultivos se volvieron más susceptibles al estrés climático (Razzaq *et al.*, 2021). Por esta razón aparece la necesidad de una segunda ola de Revolución Verde, enfocada en crear nuevas variantes domesticadas que aumenten la diversidad genética (domesticación de *novo*) y den una agricultura más sostenible y respetuosa con el medio ambiente (Ferne y Yan, 2019).

En esta segunda Revolución Verde aparece la domesticación de *novo*, la cual permite conseguir nuevas especies domesticadas a partir de la selección de rasgos agrónomos favorables conocidos de una planta de cultivo y su introducción mediante herramientas genéticas en la planta silvestre que se quiere mejorar, obteniendo una nueva especie que conserva su diversidad genética y presenta los rasgos “élite” que la hacen una opción de cultivo mejorada. Este proceso es más eficaz y rápido que la domesticación tradicional, porque se basa en el conocimiento e identificación de aquellos genes de domesticación responsables de los rasgos deseados. Sin embargo, el rendimiento y coste de este proceso están limitados por lo que se debe dar prioridad a genes relativos al punto de vista agrónomo (Yu y Li, 2022).

Con los avances de la tecnología de ingeniería genética, se plantea una nueva estrategia de domesticación vegetal que permite la posibilidad de crear nuevos cultivos hasta ahora imposibles de desarrollar; por ejemplo, plantas fijadoras de nitrógeno o nuevas especies perennes con un alto desarrollo de sus raíces (Østerberg *et al.*, 2017).

La aparición de las técnicas de edición genética permite el desarrollo de una tercera Revolución Verde, actual, que hace posible integrar en el genoma vegetal fragmentos de DNA exógeno, ya sea de otro individuo, especie o género, que presenta una característica que en el cultivo sería muy ventajosa. También es posible, mediante estas técnicas, reproducir en el cultivo una mutación que se dio en la especie y que fue crucial en su proceso de domesticación (Østerberg *et al.*, 2017).

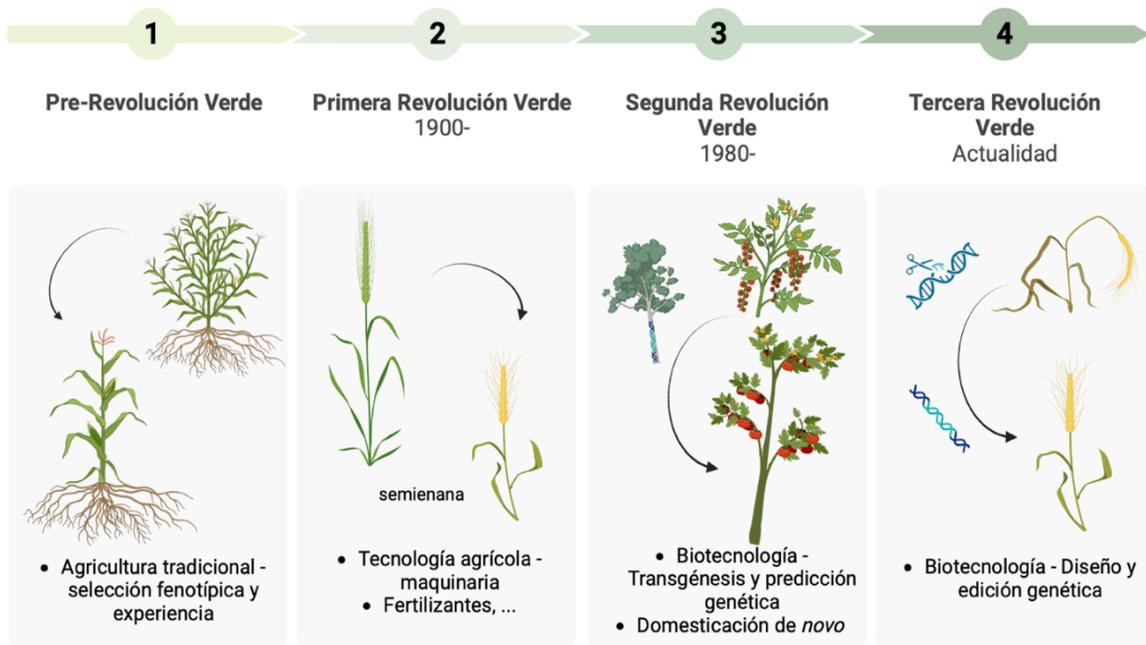


Figura 3. Línea del tiempo de la evolución de la domesticación a lo largo de la historia; domesticación tradicional del maíz (1), producción de especies semienanas de trigo (2), desarrollo de cultivos de tomate resistentes al invierno (3), edición genética de nuevos cultivos (4). Figura creada con *Bioender* basada en Fernie y Yan (2019).

2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo es resumir el conocimiento relativo al proceso de domesticación de plantas, el uso de técnicas de edición genética para este fin, con el objetivo de superar las limitaciones a las que se enfrenta actualmente la industria agrícola mundial, como la limitación de recursos o el aumento desproporcionado de la población. Para poder plantear una posible alternativa a los modelos de domesticación convencional es necesario:

1. Comprender los conceptos fundamentales relativos al proceso de domesticación y sus avances en las últimas décadas, estudiar el proceso de edición del genoma y su aplicación en la domesticación de plantas.
2. Revisar estudios que han llevado a cabo la domesticación en especies vegetales mediante edición genética.

3. Materiales y métodos

Para llevar a cabo este trabajo de fin de grado (TFG) se realizó una búsqueda bibliográfica, empleando la base de datos *PubMed*, *Web Of Science* y la editorial *Elsevier*. Para concretar la información se acortó la búsqueda utilizando como palabras clave “*crop*

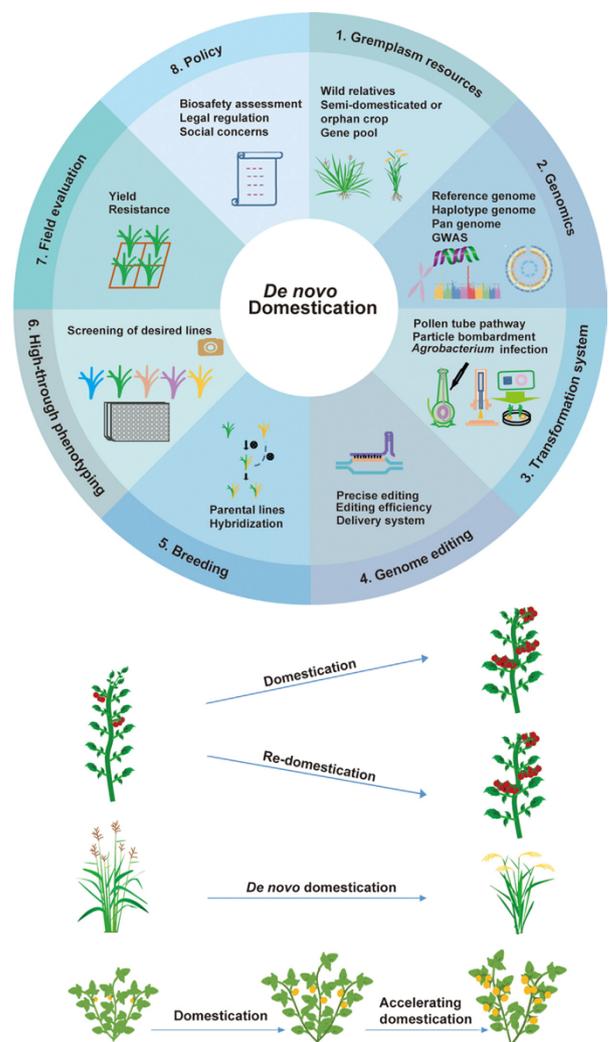
breeding”, “*speed breeding*”, “*gene editing*” y “*de novo domestication*”, ya que la búsqueda se realizó mayoritariamente en inglés. No se empleó ningún filtro de fecha para escoger los artículos, ya que el tema tratado en el trabajo es de notable actualidad y los estudios son bastante recientes, aun así, se ha intentado escoger la información más actualizada.

Como gestor bibliográfico se ha utilizado la aplicación Mendeley para el citado de artículos y la elaboración de la bibliografía, con la extensión compatible con el editor de texto *Microsoft Word*.

4. Domesticación de *novo*

La domesticación de *novo* es un concepto que se ha desarrollado rápidamente en los últimos años, y que ofrece nuevas alternativas a las rutas de domesticación explotadas hasta ahora (Yu y Li, 2022), adaptándose a las necesidades más recientes. En el año 2013, Shang y Li propusieron la idea de que el conocimiento disponible sobre los cultivos domesticados de cereales podría aplicarse para acelerar la mejora de otras especies silvestres (Zhang *et al.*, 2023b), así como permitir la redomesticación de cultivos élite a partir de sus ancestros (Figura 4). El objetivo principal de esta estrategia es reunir rasgos perdidos y deseables (evitando la pérdida de diversidad genética) con otras características agronómicas valiosas y con potencial de rendimiento (Zsögön *et al.*, 2018).

Figura 4. Esquema del proceso de domesticación de *novo*. (Zhang *et al.*, 2023b)



Esto se lleva a cabo domesticando de nuevo las plantas de las que provienen estos cultivos, recuperando alelos valiosos que se perdieron en el proceso convencional. Por ejemplo, las plantas silvestres suelen presentar una mayor tolerancia al estrés. Debido a la escasa diversidad genética en las especies cultivadas y a la compleja regulación de las

respuestas al estrés, es difícil introducir esta característica en los cultivos, por lo que se opta por domesticar directamente esta planta de nuevo. Un ejemplo de este proceso es el antecedente silvestre del tomate, *Solanum pimpinellifolium*, que tiene una resistencia natural al estrés salino, además de a algunas enfermedades bacterianas (Zhang *et al.*, 2023b). Zsögön *et al.* (2018) identificaron al menos seis *loci* clave para la domesticación del cultivo, relativos al tamaño del fruto, forma, calidad nutricional, etc; y, mediante edición genética, los modificaron para conseguir la mejora del fruto conservando la tolerancia natural de la planta silvestre.

Otra razón importante para redomesticar un cultivo es la pérdida de disponibilidad de metabolitos secundarios. En el caso de las legumbres, la domesticación a lo largo de los años ha permitido la selección de algunos metabolitos secundarios involuntariamente, debido a la proximidad de sus genes con otros responsables de nutrientes principales o un mayor rendimiento, o el papel de la composición de algunos metabolitos en la mejora del cultivo (Ku *et al.*, 2020). Sin embargo, la reducción de metabolitos secundarios es evidente, ligada a la disminución de biodiversidad de los cultivos. Recuperar y mantener la biodiversidad de las legumbres es una tarea importante ya que suponen un gran potencial como fuentes de compuestos activos para uso farmacéutico, además de su importancia nutricional. De esta manera, es posible el uso de legumbres silvestres en programas de mejora o ingeniería metabólica para aprovechar los beneficios que ofrecen (Ku *et al.*, 2020).

4.1. Domesticación de *novo*: ingeniería genética

El desarrollo de la domesticación de *novo* ha evolucionado rápidamente gracias a la aparición y avance de técnicas de ingeniería genética, culminando en la edición del genoma, como se puede ver en la Figura 5.

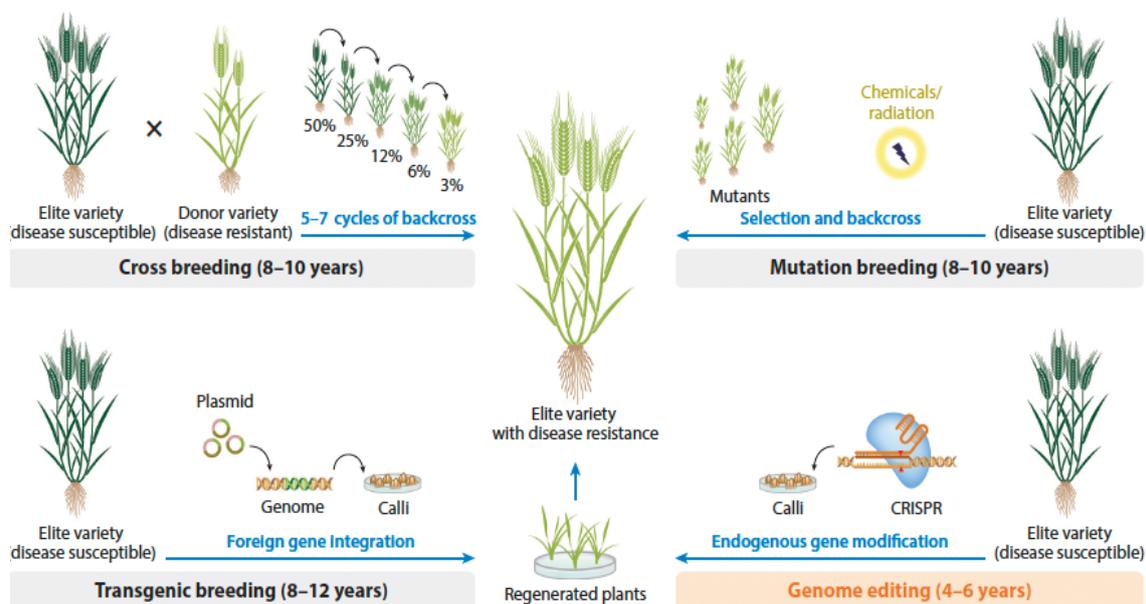


Figura 5. Esquema de los diferentes tipos de vía de domesticación por cruzamiento, mutación, transgénesis o edición genética. (Chen *et al.*, 2019)

Una de las vías más utilizadas en estas estrategias es el silenciamiento génico, con el cual se obtienen plantas llamadas *knock-out*, es decir, con la expresión de un gen completamente anulada, o plantas *knock-down*, donde la expresión del gen solo se ve reducida (el silenciamiento génico es parcial). Este silenciamiento puede darse previo a la transcripción, es decir, en la secuencia DNA del gen objetivo; o postranscripcional (PTGS). La última opción es la más eficaz y, por tanto, la que se utiliza mayormente.

El PTGS aprovecha el mecanismo del RNA de interferencia (siRNA), que son pequeños fragmentos de pocas pares de bases procedentes del corte de moléculas de RNA mensajero (mRNA) de doble cadena (dsRNA), formadas por la RNA polimerasa II y complementarias al RNA molde. Estos fragmentos son resultantes de la acción de una enzima endonucleasa específica de dsRNA (Quiñones *et al.*, 2007), denominada DICER-like en el caso de las plantas. Estas pequeñas secuencias de nucleótidos serán reconocidas por un complejo proteico, como se puede ver en el esquema de la Figura 6, denominado complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), el cual degradará cualquier mRNA que pueda unirse complementariamente a los siRNA que reconoce, silenciando esta parte del genoma (Barrientos *et al.*, 2021).

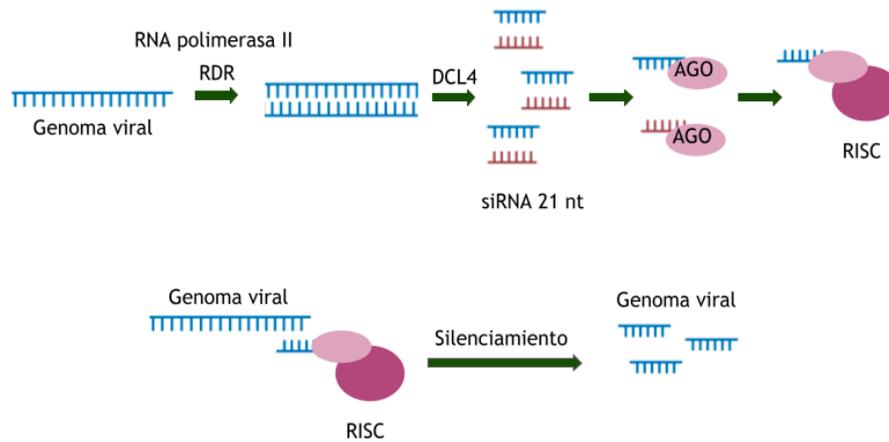


Figura 6. Sistema DICER-RISC – Mecanismo molecular de silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) de genoma viral en respuesta a una infección vírica; siendo RDR la RNA-polimerasa RNA-dependiente, DCL4 -la endonucleasa DICER-like- y AGO -la proteína argonauta que se asocia al complejo RISC- (Barrientos *et al.*, 2021).

Este sistema DICER-RISC se aprovecha en ingeniería genética ya que se ha demostrado que se puede activar este mecanismo natural de defensa aumentando los niveles de mRNA de un gen de interés por encima de un umbral o introduciendo directamente secuencias siRNA del gen que se quiere silenciar.

Un ejemplo de esta estrategia se llevó a cabo en el proceso de mejora de la calidad de aceite en semillas de la planta de mostaza silvestre (*Lepidum campestre*). Esta planta silvestre tiene rasgos agronómicos muy interesantes, lo que la convierte en una buena candidata de domesticación para obtener una nueva semilla oleaginosa. Para que su cultivo sea económicamente rentable se ha modificado la composición de aceite de su semilla, a través del silenciamiento de secuencias de siRNA de los genes *fad2* y *fae1*, responsables de la biosíntesis de ácidos grasos. De esta manera se ha aumentado el contenido de ácido oleico de 11 al 80 %, resultando en un cultivo mucho más rentable y apto para la industria alimentaria (Ivarson *et al.*, 2016).

Otro ejemplo exitoso de PTGS con RNA interferente es la inhibición de la expresión del gen que codifica para la proteína de la cápside del virus del encrespamiento amarillo de la hoja del tomate (TYLCV), donde las plantas de *Nicotiana benthamiana* tratadas presentaban una ausencia de síntomas típicos de la enfermedad del geminivirus (Quiñones *et al.*, 2007).

Un mecanismo de silenciamiento genético alternativo es el uso de RNAs antisentido, complementario al mRNA objetivo, por ejemplo, un RNA viral. Cuando estas moléculas interactúan y forman un complejo, este es degradado impidiendo la expresión del

genoma viral. Esta ruta se ha empleado en plantas de *N. benthamiana* para el desarrollo de resistencia al virus del mosaico dorado del tomate (TGMV) (Quiñones *et al.*, 2007).

Otra estrategia aplicada en ingeniería genética es la mutagénesis aleatoria, a través de la cual se consigue mimetizar la domesticación en genes objetivo (Fernie y Yan, 2019). Un ejemplo de esta aplicación es la domesticación de una especie de hierba australiana similar al arroz (*Microlaena stipoides*), con un gran potencial como nuevo cultivo de cereales. Como gran parte de los cultivos en Australia, estas plantas han evolucionado independientemente de otros ambientes mundiales, lo que ofrece una nueva reserva genética de partida para el desarrollo de nuevos cultivos. En este estudio se llevó a cabo una mutagénesis química que, basándose en los conocimientos del arroz cultivado – *Oryza sativa* (con el que comparte un ancestro común), permitió la mejora en el tamaño y rendimiento del grano de *M. stipoides* (Shapter *et al.*, 2013).

4.2. Domesticación de cultivos huérfanos

Los cultivos huérfanos son especies cultivadas “infrautilizadas” (Yaqoob *et al.*, 2023) con características nutritivas importantes y adaptadas al cultivo, sin embargo, no lo suficientemente rentables para ser aptas para la agricultura intensiva. Su valor económico mundial es limitado, lo que hace que la investigación respecto a sus características sea escasa, sin embargo, a nivel local tienen una importancia elevada, debido principalmente a sus características nutritivas y de adaptación a las condiciones ambientales de la zona. Incluyen principalmente cereales, tubérculos y leguminosas, teniendo una gran importancia en la seguridad nutricional de las comunidades en las que se encuentran (Chiurugwi *et al.*, 2019).

Además de sus propiedades nutritivas suelen presentar características ventajosas para el cultivo, como resistencia al estrés o alta eficiencia fotosintética. Es por ello que, en los últimos años, se ha secuenciado el genoma de varios de estos cultivos y sus parientes silvestres, con el objetivo de obtener información sobre genes ortólogos y posibles vías de domesticación (Yaqoob *et al.*, 2023). Gracias a la secuenciación de su genoma, es posible entender la estructura y expresión de sus genes, sin embargo, su domesticación se encuentra algo limitada debido a la regulación multigénica de muchos de sus rasgos de cultivo (Yaqoob *et al.*, 2023).

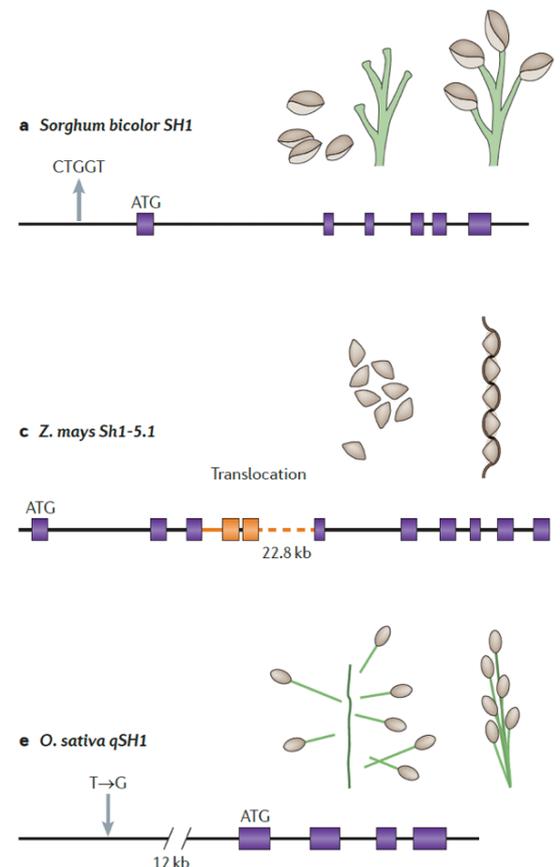
Ya se han hecho estudios de domesticación de cultivos huérfanos utilizando técnicas de edición genética, donde se centran en la modificación de genes cuyos ortólogos en

cultivos cercanos tienen un papel importante en los rasgos de domesticación (Yaqoob *et al.*, 2023). Estos ensayos se llevan a cabo para identificar los mecanismos más eficientes para la domesticación de las especies e identificar los objetivos genéticos necesarios. Por ejemplo, con el enfoque CRISPR-Cas9 se han desarrollado métodos eficientes de transformación de cultivos huérfanos de *Physalis pruinosa* (cereza molida) de la familia *Solanaceae*, editando genes ortólogos con un papel importante en la domesticación del tomate, de la misma familia (Lemmon *et al.*, 2018). Características como el tamaño del fruto o la producción de flores mejoraron la productividad del cultivo (Yaqoob *et al.*, 2023).

Como se puede ver en la Figura 7, diferentes mutaciones provocadas en genes ortólogos de diferentes especies de cereales ofrecen las mismas ventajas en los cultivos domesticados.

El gen *SH1* presente en *Sorghum bicolor* (sorgo) es responsable de la caída de las semillas en las plantas silvestres. Este fenotipo presenta una desventaja en los cultivos domesticados, de manera que, mediante una deleción en la región reguladora del gen, se provoca la pérdida de función (Lin *et al.*, 2012) y, por tanto, la pérdida de caída de las semillas. Del mismo modo, en las especies de maíz (*Z. mays*) y arroz (*O. sativa*) existen genes ortólogos con la misma función. En estos casos se provocaron otro tipo de mutaciones, como se puede ver en la figura, para conseguir la pérdida del fenotipo (Meyer y Purugganan, 2013).

Figura 7. Ejemplos de diferentes tipos de mutaciones en genes ortólogos responsables de la caída de las semillas. **a.** Deleción en la zona reguladora del gen *SH1* de sorgo. **c.** Traslocación que provoca la fusión de dos exones del gen *SH1-5.1* de maíz. **e.** Polimorfismo de una sola base (SNP) en el promotor del gen *qSH1* de arroz. (Meyer y Purugganan, 2013).



5. Speed breeding

La cría convencional de cultivos supone una serie de procedimientos, desde la selección de los progenitores con rasgos deseables hasta el cultivo y selección de la progenie, que requieren unos intervalos de tiempo muy amplios, llegando a cumplir las décadas. En el

sistema mundial de demanda y consumo actual, estos tiempos son inabarcables, más teniendo en cuenta la limitación de recursos y el aumento descontrolado de la población.

La mejora rápida o *speed breeding* es un modelo de cultivo que permite acelerar el proceso de cría de las especies domesticadas para que su cosecha sea más eficaz y productiva. Gracias a esta estrategia el tiempo de generación de un cultivo disminuye considerablemente, consiguiendo un mayor número de generaciones del mismo cultivo en un mismo periodo de tiempo, por ejemplo, en cultivos de garbanzo es posible desarrollar 7 generaciones por año (Wanga *et al.*, 2021), siendo lo habitual un máximo de 3-4. Este método fue comprobado por primera vez en la especie *Triticum aestivum* de trigo, estudiando la latencia del grano en condiciones ambientales controladas (Hickey *et al.*, 2009), lo que resultó en seis generaciones de cultivos en un solo año.

En este modelo se logra avanzar a la próxima generación de cría lo más rápido posible manipulando las condiciones ambientales en las que se cultivan los genotipos (Begna, 2022), ofreciendo también la posibilidad de obtener genotipos homocigotos y estables rápidamente (Wanga *et al.*, 2021). A diferencia de la tecnología doble haploide, centrada en la generación de líneas homocigóticas, en este caso no se requiere de equipos especializados en cultivo *in vitro* ya que se puede aplicar en una amplia gama de germoplasma (Begna, 2022). Al modificar las condiciones ambientales de la cosecha se alcanza una ventaja de cara a los agricultores cuyo objetivo es aumentar la productividad de sus cultivos sin afectar a la diversidad de especies por el uso de productos químicos o fertilizantes (Sharma *et al.*, 2023).

Watson *et al.* (2018) describieron tres protocolos de mejora acelerada, jugando con los diferentes factores ambientales clave en la reproducción convencional, con cámaras de crecimiento ambiental controlado, mejora en invernadero o salas de crecimiento caseras. Los factores ambientales controlables con los que se manipulan estos cultivos son, por ejemplo, las condiciones de fotoperiodo, temperatura, humedad del suelo o niveles de nutrientes (Figura 8) (Wanga *et al.*, 2021). En el caso de Watson *et al.* (2018) las condiciones específicas eran similares en todos los casos: 22 horas de fotoperiodo, 70 % de humedad, luz de alta intensidad y una temperatura de entre 22 y 17 °C (Pandey *et al.*, 2022).

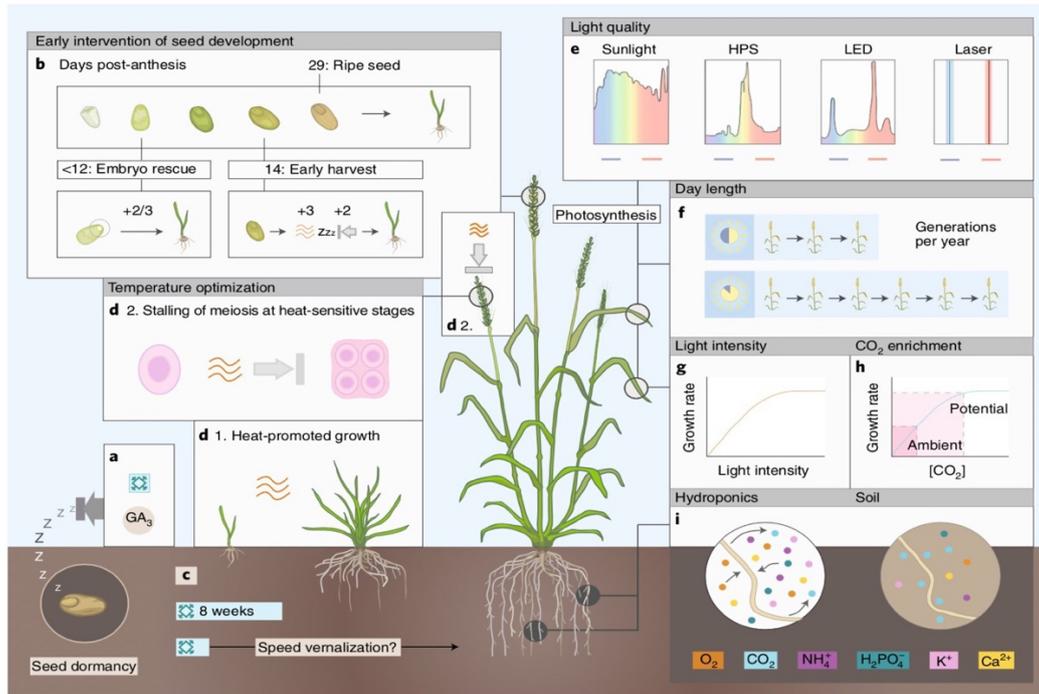


Figura 8. Esquema de los factores ambientales clave en la optimización de un cultivo mediante *speed breeding*. (Hickey *et al.*, 2019).

5.1. Estrategias para acelerar el proceso de cultivo

La domesticación combinada con *speed breeding* está demostrada con éxito en plantas poliploides como el plátano o el cacahuete. En el caso del cacahuete (*Arachis hypogaea*), O'Connor *et al.* (2013) determinaron en un estudio la viabilidad del enfoque de mejora rápida en comparación con el cultivo convencional (Begna, 2022), demostrando que el tiempo de desarrollo de las generaciones se reduce considerablemente, de 42 a 17 meses (Figura 9) (O'Connor *et al.*, 2013).

Breeding System	Year 1												Year 2												Year 3												Year 4											
Speed - SSD	F2			F3			F4			F5																																						
Month	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A							
Pedigree - Winter Nursey	F2			F3			F4			F5																																						
Pedigree - Traditional	F2			F3			F4			F5			F4			F5																																
	Year 1			Year 2			Year 3			Year 4																																						

Figura 9. Línea del tiempo comparando tres estrategias de mejora diferentes para alcanzar la generación F6. En verde el diseño de *speed breeding* y SSD (O'Connor *et al.*, 2013).

En este estudio se combina el cultivo rápido con otro sistema de cultivo: el método de descendencia de semilla única (SSD - *single seed descent*). SSD es un método de avance de generación rápida donde se obtienen generaciones en invernadero con tiempos de reproducción acelerados (Gudi *et al.*, 2022). Solo se requiere de una semilla para avanzar en cada generación, y es habitual para facilitar el desarrollo de líneas homocigotas a través de la endogamia (Watson *et al.*, 2018), requiriendo menos espacio y mano de obra. La

variedad de arroz “Nipponbare” fue la primera variedad comercial creada por este método (Gudi *et al.*, 2022). El *speed breeding* puede aplicarse combinado con varios métodos de selección, siendo los más apropiados SSD, SPD (descendencia de una sola vaina - *single pod descent*) y SPS (selección de una sola planta - *single plant selection*) (Wanga *et al.*, 2021).

Existen numerosas herramientas asistidas por genómica que permiten la oportunidad de mejorar el crecimiento y productividad de un cultivo mediante marcadores basados en DNA seleccionando los mejores cruces en condiciones ambientales cambiantes (Rai, 2022). La selección asistida por marcadores (MAS – *marker-assisted selection*) es un método muy utilizado para acelerar el proceso de mejora de cultivos de cereales, mediante la selección de rasgos específicos del cultivo. Los datos fenotípicos necesarios para identificar los marcadores moleculares específicos de la especie, como un gen de resistencia a un patógeno en un cultivo de tomate (Arruabarrena *et al.*, 2015), se adquieren a través de tecnologías de secuenciación de segunda generación (NGS), lo cual supone de momento un obstáculo en la aplicación de esta herramienta de selección en muchas especies (O’Connor *et al.*, 2013).

La combinación de estas técnicas ofrece una estrategia de mejora de cultivos por retrocruzamiento ideal para incorporar un rasgo hereditario simple en un genotipo (O’Connor *et al.*, 2013). Sin embargo, a pesar de que el uso de estas técnicas es un enfoque muy valioso para los programas de domesticación convencionales, MAS y la ingeniería genética, la mejora acelerada necesita un conjunto integrado de recursos y habilidades que, en zonas del mundo poco desarrolladas, son inabarcables para los gobiernos, lo que limita el uso de estas herramientas en el sector público (Wanga *et al.*, 2021). La selección genómica se ha demostrado recientemente que es capaz de superar algunas limitaciones propuestas por MAS, teniendo en cuenta una gama mayor de aspectos del cultivo, utilizando marcadores de todo el genoma (Begna, 2022), sin embargo, sigue teniendo una aplicación limitada debido a su elevado coste y las dificultades que todavía plantea su aplicación.

Este mecanismo de mejora acelerada es muy importante en proyectos de domesticación mediante edición genética. La introducción de genes en un cultivo provoca ciertas problemáticas relacionadas con la naturaleza transgénica de la introducción de un gen. Una vez el transgén seleccionado es integrado en el genoma objetivo, es necesario confirmar que la ubicación de la integración es la adecuada y evitar efectos de posición.

Para ello se llevan a cabo pruebas de progenie que identifiquen la ubicación y los niveles de expresión del nuevo gen, lo cual alarga considerablemente el desarrollo de los cultivares élite en el tiempo (Gepts, 2002).

Un nuevo enfoque de *speed breeding* prometedor para acelerar la domesticación de plantas silvestres es la técnica “ExpressEdit” (Figura 10), donde se reduce el tiempo de generación de cultivos modificados genéticamente (Sharma *et al.*, 2023). En este caso las herramientas de edición genética (el gen Cas9 y las secuencias de sgRNA – RNA guía sintético) se introducen directamente en las células vegetales (semillas maduras, por ejemplo), sin necesidad de regenerarlas en laboratorio. La descendencia se somete a una selección directa para detectar las plantas que presentan un rasgo nuevo, con o sin el gen Cas9. La progenie segregada se aísla para obtener el nuevo rasgo (Haroon *et al.*, 2022), y aquellas plantas que no contienen el gen de Cas9, pero presentan un nuevo rasgo de interés también se seleccionan (Sharma *et al.*, 2023). Por otro lado, aquellas que han integrado el gen y contienen Cas9 se pueden someter a otros ciclos de edición genética (Haroon *et al.*, 2022).

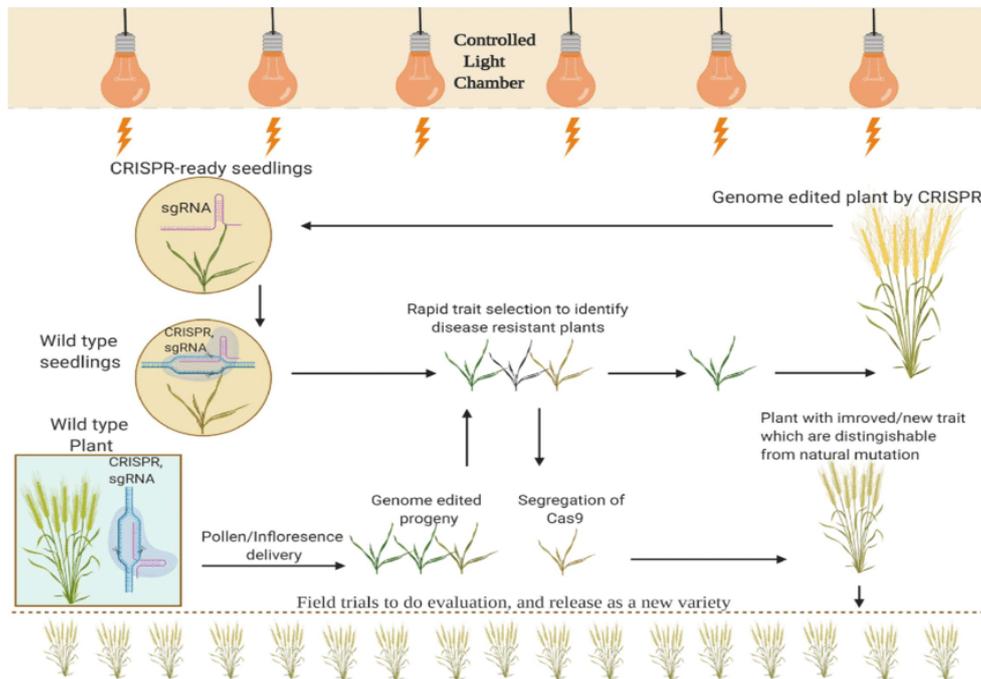


Figura 10. *Speed breeding* combinado con edición genética mediante CRISPR-Cas9 a través de *ExpressEdit*, donde se acorta el tiempo de generación del cultivo. (Haroon *et al.*, 2022)

Mediante técnicas de ingeniería genética también es posible modificar el tiempo de cultivo de algunas especies silvestres para acelerar su tiempo de generación. Un ejemplo es el caso de los árboles frutales, donde se han llevado a cabo pruebas de mutaciones en

genes relacionados con la floración temprana. Al modificar genes como *FT* en cítricos o *LFY* en manzana, se consigue reducir el periodo juvenil de los cultivos (de 7 a 2 años en el caso del castaño) además de acelerar la introgresión de rasgos de interés. Esta aproximación se conoce como “FastTrack” (Gudi *et al.*, 2022).

6. Edición genética

La cría convencional y cría por mutaciones ofrecen una estrategia de domesticación y mejora de cultivos muy prometedora y hasta ahora eficaz, pero, teniendo en cuenta la limitación de los genes y alelos de las especies (Bhatta y Malla, 2020), estos enfoques no son suficientes para cumplir con los objetivos del alto rendimiento, ya que necesitan muchos años para introducir los alelos de interés y la variabilidad de recombinación genética es muy reducida (Chen *et al.*, 2019).

La cría transgénica, en la que se introduce material genético exógeno que aporta nuevos rasgos deseables en el cultivo elite, supone un nuevo enfoque que puede ayudar a superar estas limitaciones, generando organismos transgénicos, aunque normalmente son cultivos resistentes a insectos o herbicidas, ya que el repertorio de genes extraños es limitado (Zhang *et al.*, 2021). Estos productos, además de suponer una alta inversión de tiempo y dinero, no superan la aprobación pública en algunos países (Chen *et al.*, 2019).

Todas estas estrategias, tras la aparición de la edición génica, quedan completamente superadas en eficacia, ya que estas últimas permiten modificar únicamente el DNA deseado, siendo vías mucho más definidas (Dheer *et al.*, 2020). Las técnicas de edición genética consisten en localizar de forma precisa una secuencia específica en un genoma y alterar las secuencias objetivo con fines concretos (Zhang *et al.*, 2021). Al ser una vía más precisa, también evita el cambio de genes no objetivo, que pueden sufrir silenciamiento o cambio de expresión como consecuencia de cambios aleatorios inducidos (Zhang *et al.*, 2021).

La primera aplicación de esta orientación se realizó en la planta de tabaco (*Nicotiana tabacum*) en 1988 y con ella surgió el descubrimiento de las roturas de doble hebra (DSB), concepto fundamental en el desarrollo de las técnicas utilizadas posteriormente (Chen *et al.*, 2019). El reconocimiento de las secuencias específicas en las que se inducen los cortes se lleva a cabo por unas enzimas llamadas nucleasas dirigidas al sitio (SDN), que permiten romper la doble cadena de la secuencia de DNA objetivo (Dheer *et al.*, 2020) y así aumentar la precisión de la modificación del gen (Biswas *et al.*, 2021). Existen cuatro

tipos de nucleasas SDN utilizadas actualmente: meganucleasas, nucleasas de dedos de Zinc (ZFN), nucleasas activadoras de la transcripción (TALEN) y nucleasas CRISPR (de las siglas en inglés *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*); en su orden de descubrimiento (Zhang *et al.*, 2021).

Estas nucleasas específicas del sitio cortan con precisión la doble hebra del DNA genómico de *loci* específicos, desencadenando sistemas de reparación moleculares especializados: unión de extremos no homólogos (NHEJ: *Non-homologous DNA end joining*) y reparación dirigida por homología (HDR: *Homology-directed repair*) (Arora y Narula, 2017). En estas dos vías de reparación se basan los mecanismos de edición genómica, pudiendo dar lugar a *knock-out* (eliminación de un gen), mediante la vía NHEJ, o, mediante la vía HDR, *knock-in* (inserción de un gen) o modificación de este empleando una secuencia “plantilla” para la reparación (Hua *et al.*, 2019). También se pueden introducir varias roturas DSB simultáneamente, pudiendo desencadenar la reorganización de regiones cromosómicas, inversiones y traslocaciones (Biswas *et al.*, 2021).

6.1. Estrategias de domesticación mediante ZFN

Las nucleasas de dedos de Zinc constituyen uno de los mecanismos de edición genética más antiguos (Arora y Narula, 2017). Consisten en enzimas de restricción artificiales, diseñadas mediante la fusión de dominios de unión al DNA específicos de secuencia (ZFP; proteínas de dedo de Zinc) y un dominio de escisión inespecífico de la endonucleasa *FokI* (Biswas *et al.*, 2021). Esta enzima de restricción *FokI* es de tipo homodimérica, lo que significa que para generar una rotura DBS necesita dimerizarse (Razzaq *et al.*, 2019), de manera que las nucleasas solo funcionan en pares funcionales.

Cada dominio de unión al DNA es capaz de reconocer un codón específico, sin embargo, los dedos de zinc se encuentran en mayor número (al menos tres), formando junto a *FokI* el dominio ZFN, es decir, cada ZFN es capaz de reconocer al menos 3 aminoácidos en cada dímero. Esto significa que cada nucleasa ZFN puede reconocer una secuencia de DNA específica de entre 18 y 24 pares de bases (pb) (Arora y Narula, 2017).

Aunque esta tecnología ha sido empleada exitosamente en estudios de *Arabidopsis thaliana*, soja o maíz (Razzaq *et al.*, 2019), ha quedado superada por otras técnicas similares, ya que supone un lento desarrollo de las enzimas capaces de reconocer y cortar la secuencia diana, tiene una baja especificidad (Biswas *et al.*, 2021) y genera muchas

mutaciones *off-target* (aquellos cambios en la secuencia no deseados, que se dan fuera del objetivo) (Arora y Narula, 2017).

6.2. Estrategias de domesticación mediante TALEN

Las TALEN son otro ejemplo de nucleasas que sustituyeron a las ZFN, aunque su modo de acción es similar. Su mecanismo se basa en segmentos largos de secuencias efectoras similares a activadores de la transcripción (TALE). Estas secuencias son naturales y se pueden unir al dominio *FokI* (similar a los dedos de Zinc). De esta manera surgen las nucleasas, con un dominio de unión al DNA editable y un dominio de escisión inespecífico *FokI* (Arora y Narula, 2017).

El método de acción se basa en la edición de los nucleótidos repetidos de TALE necesarios para el reconocimiento de la secuencia de DNA específica, de manera que sean capaces de reconocer la secuencia objetivo, y luego la asociación con *FokI*. Son capaces de reconocer una secuencia de entre 12 y 21 pb (Razzaq *et al.*, 2019). Como ya hemos mencionado, la enzima de restricción necesita dimerizar, por lo que las nucleasas TALEN funcionan en pares. Cada dominio efector reconoce un par de nucleótidos de TALEN, lo que hace esta estrategia mucho más específica respecto a la secuencia objetivo (Biswas *et al.*, 2021).

Las TALENs han demostrado ser una técnica eficaz para generar mutaciones no homólogas en diversos organismos (Arora y Narula, 2017), aunque siguen presentando limitaciones respecto a otras estrategias, ya que se sigue necesitando el ensamblaje de repeticiones en tándem para reconocer la secuencia objetivo (Razzaq *et al.*, 2019).

En el ámbito del fitomejoramiento, se han conseguido resultados prometedores utilizando las nucleasas TALEN, por ejemplo, confiriendo a cultivos de trigo resistencia a la enfermedad del oídio, un patógeno fúngico, mediante el *knock-out* de tres genes *MLO* (*mildew-resistance locus*) (Zhang *et al.*, 2021).

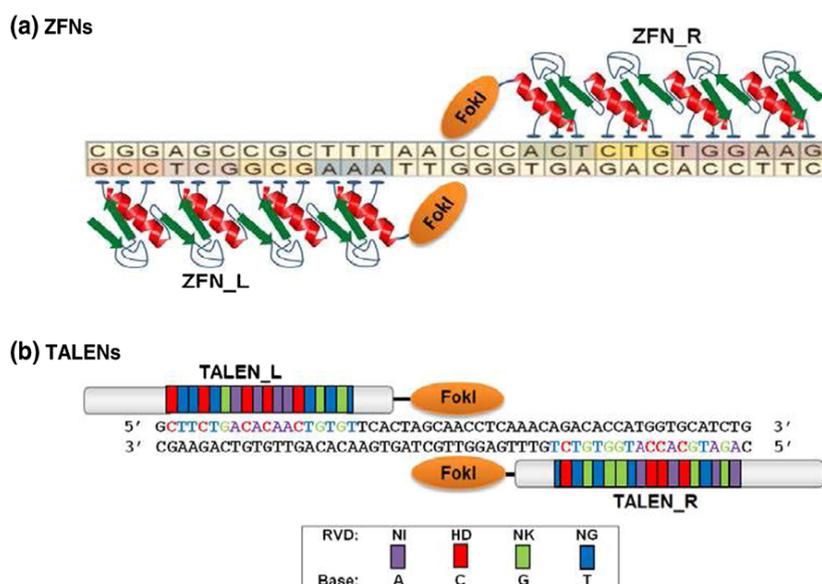


Figura 11. Esquema del mecanismo de acción de las técnicas de edición genética: ZFN (a) y TALEN (b). (Chandrasegaran y Carroll, 2016).

6.3. CRISPR-Cas9

Las siglas en inglés que confieren a este mecanismo el nombre CRISPR se traducen como: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (en español: Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas).

CRISPR-Cas es un sistema de defensa inmunitaria adaptativo de algunas bacterias que funciona integrando fragmentos de los ácidos nucleicos de microorganismos patógenos que las invaden en secuencias CRISPR como nuevos espaciadores (Zhang *et al.*, 2023a). Esto permite que, en una posible invasión por parte de estos patógenos, la bacteria es capaz de reconocer la amenaza y actuar en su interferencia para destruirlos.

La primera vez que se clonó una secuencia CRISPR fue en una bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) en 1987, inintencionadamente. Durante años no se conocía la función de estas secuencias, por lo que se utilizaban únicamente para tipificar cepas de bacterias y arqueas. Con el descubrimiento de las proteínas asociadas a CRISPR (Cas), responsables del corte de la doble hebra de RNA, se empezó a comprender la función real de estas secuencias repetidas en la defensa natural bacteriana (Zhang *et al.*, 2021).

Su funcionamiento como herramienta de edición genética se empezó a estudiar gracias a la capacidad de reconstruir todos los elementos involucrados *in vitro*. Según estudios relacionados, se ha demostrado que se necesitan tres componentes principalmente: la proteína Cas, un RNA CRISPR (crRNA) y un transactivador de este (tracRNA) (Zhang

et al., 2021). Los dos últimos fragmentos se pueden construir juntos, creando una única molécula de RNA sintética conocida como RNA guía (sgRNA). Esta secuencia tiene como función guiar la proteína Cas al fragmento de ácidos nucleicos que se quiere modificar, de manera que, al alterarse, la secuencia es reparada por el mecanismo natural de la bacteria.

La reparación no homóloga (NHEJ) suele resultar en un *knock-out* de la diana ya que es propenso a errores de inserción/delección (Juma *et al.*, 2021) (Figura 12). Cuando se quiere modificar una secuencia sustituyéndola por otra artificial se recurre a la reparación homóloga dirigida (HDR), que reduce los efectos *off-target* considerablemente. De esta manera se pueden alcanzar diferentes cambios en el genoma diana, desde la eliminación o inserción de un gen, el reemplazo de un fragmento de la secuencia hasta la edición de pares de base concretas mediados por el sistema CRISPR-Cas (Zhang *et al.*, 2021).

Existen diferentes tipos de proteínas Cas, como la Cas9 ampliamente utilizada. La nucleasa Cpf1 (también conocida Cas12a) se ha descubierto en los últimos años y presenta numerosas ventajas respecto a la anterior mencionada, incrementando la eficacia de *knock-in* de genes y la capacidad de insertar genes a través de reparación NHEJ (Biswas *et al.*, 2021).

Las bibliotecas de gRNA son una herramienta de estudio de la genómica funcional de las especies que permiten caracterizar los genes a nivel de genoma y estudiar la relación genotipo-fenotipo (Zhang *et al.*, 2023a).

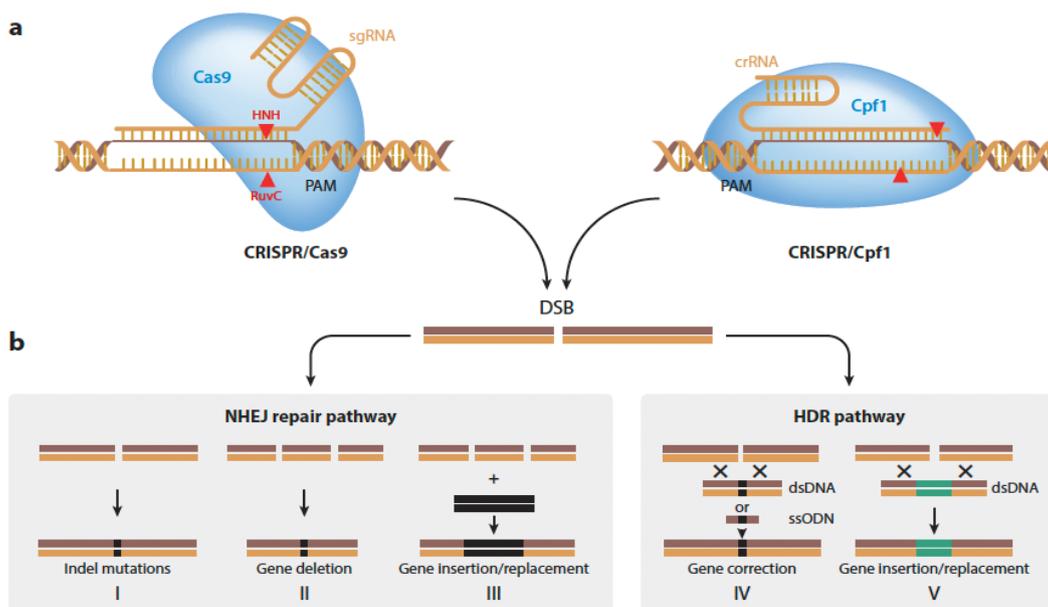


Figura 12. Esquema del mecanismo de edición genética mediante CRISPR-Cas9, con las dos posibles vías de reparación génica: no homóloga (NHEJ) y homóloga (HDR). (Chen *et al.*, 2019)

CRISPR-Cas se ha utilizado exitosamente en muchos cultivos en las últimas décadas con el fin de mejorar el rendimiento de estos. Unos de los ejemplos más notables es la edición de cultivos de arroz (*Oryza sativa*), donde se crearon mutaciones de pérdida de función en los genes *Gn1a*, *GS3* y *DEP1*, relacionados con el número de granos, su longitud o densidad (Østerberg *et al.*, 2017). También se han conseguido desarrollar cultivos resistentes a patógenos e infecciones (como la resistencia de cultivos de sandía a *Fusarium* mediante el *knock-out* del gen *Clpsk1*), a estreses abióticos o con un metabolismo secundario mejorado (Zhang *et al.*, 2021) (como en el caso de las legumbres mencionado por Ku *et al.* (2020).

Las estrategias de edición del genoma se pueden centrar en dos vías diferentes: la edición de rasgos controlados principalmente por un solo gen o aquellos aspectos agronómicos regulados por un conjunto genético complejo (Hua *et al.*, 2019). En el primer caso, la tecnología de CRISPR-Cas9 resulta muy eficaz, ya que es menos invasiva y más eficiente que los métodos convencionales. De esta manera, por ejemplo, se han conseguido domesticar cultivos de soja (*Glycine max*) mediante la mutagénesis dirigida del gen *FT2a*, homólogo del gen *FT* identificado en *Arabidopsis thaliana* como responsable del florigen (inducción de la floración). Gracias a la tecnología de edición genética se consiguió la pérdida de función del gen, alargando el tiempo de floración del cultivo y permitiendo la adaptación de plantas mutantes no transgénicas a condiciones ambientales cambiantes (Cai *et al.*, 2018).

Mediante CRISPR-Cas también es posible redomesticar cultivos ya explotados a través de un nuevo enfoque e, incluso, domesticar plantas silvestres que no han sido cultivadas hasta ahora. Un ejemplo de redomesticación es el del cultivo de la patata en líneas diploides por Ye *et al.* (2018). En este caso emplearon el sistema CRISPR-Cas9 para redomesticar la patata mediante el *knock-out* del gen de autoincompatibilidad de la S-RNAasa (Hua *et al.*, 2019), creando patatas diploides autocompatibles (Ye *et al.*, 2018), es decir, que son capaces de autopolinizarse.

También es posible la domesticación de cultivos huérfanos mediante la edición del genoma de genes ortólogos a aquellos con un papel importante en la domesticación de cultivos cercanos, como es el caso de la domesticación de la cereza molida (Lemmon *et al.*, 2018). En estos cultivos de especies huérfanas, la edición genética también permite la eliminación de aquellos rasgos indeseables que presentan las plantas silvestres más rápidamente que la domesticación convencional (Pattnaik *et al.*, 2023).

Una aproximación reciente en la domesticación de nuevas especies es la obtención de variedades de árboles forestales altamente productivas para suplir la demanda creciente de madera. De esta manera, las nuevas plantaciones leñosas tienen una calidad de madera optimizada (Anders *et al.*, 2023), además de ser más productivas a la hora de su mejora. Para obtener estos objetivos se puede llevar a cabo una edición multiplex de genes (Figura 13) involucrados en la ruta de biosíntesis de la lignina (responsable del grosor del tallo en las plantas leñosas), tras diversos estudios de genética inversa que identifiquen la función de los genes individuales, para crear variantes alélicas múltiples que potencien los rasgos de calidad de la madera. Otra alternativa de genes objetivo es la identificación de *loci* de rasgos cuantitativos (QTL) a través de estudios de asociación de genoma completo. Gracias a la edición multiplex en germoplasma de élite se generan una gran cantidad de variantes alélicas en múltiples QTL, buscando nuevas combinaciones alélicas que superen el clon parental (Anders *et al.*, 2023).

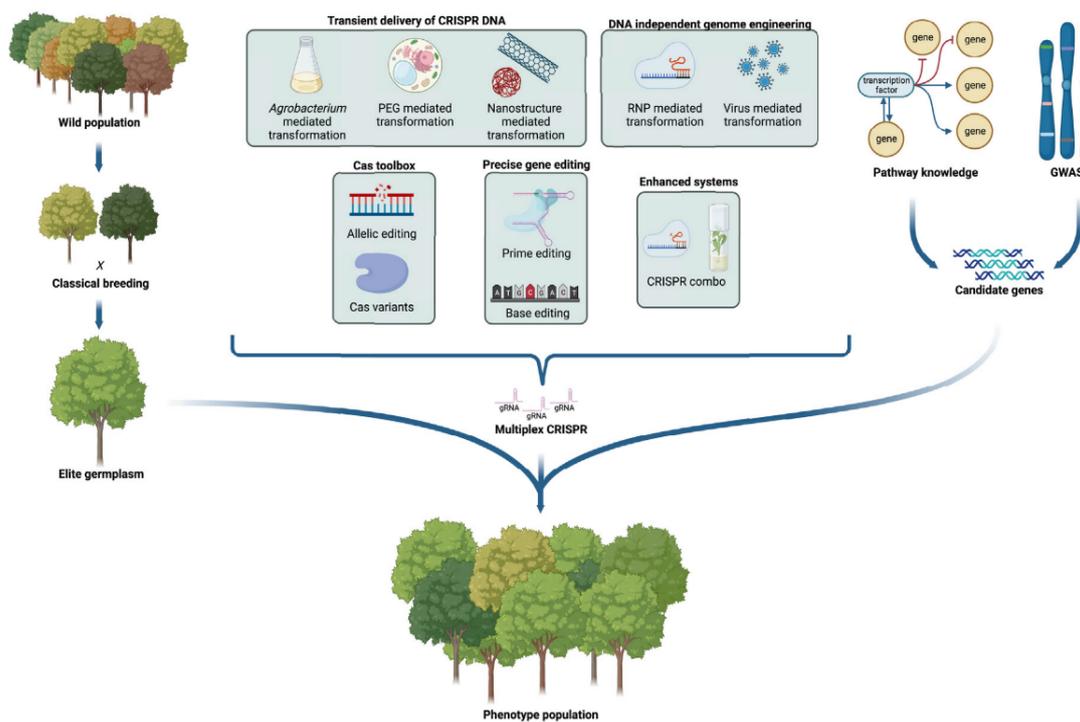


Figura 13. Esquema del proceso de domesticación de plantas leñosas acelerado mediante técnicas de edición genética. (Anders *et al.*, 2023).

7. Conclusión y perspectivas futuras

A pesar de que el enfoque de aplicación de técnicas de edición genética en los procesos de domesticación de cultivos es bastante prometedor y, hasta ahora, ha demostrado ser una alternativa muy eficiente respecto a los métodos convencionales, su aplicación se ve a veces limitada por la escasez de información genética relativa al control de los rasgos agrícolas importantes (Hua *et al.*, 2019).

El coste del desarrollo de la tecnología de secuenciación del DNA de estas estrategias en los cultivos huérfanos todavía supone un obstáculo para la aplicación de estas técnicas (Hua *et al.*, 2019). La creación de bases de datos -ómicas supondrán un avance notorio para la identificación de los objetivos génicos para la edición.

El avance en los últimos años de la inteligencia artificial (IA) también ofrece ventajas en el mundo de la domesticación y el fitomejoramiento. Mediante el empleo de modelos relevantes y algoritmos concretos, la IA es capaz de reconocer y analizar una amplia gama de datos complejos, así como mejorar la precisión de los datos multiómicos (Rai, 2022).

Además, en este campo de investigación es muy importante prestar especial atención a las barreras culturales. Las mejoras tecnológicas en los cultivos convencionales a menudo se han visto obstaculizadas por el rechazo cultural, como los alimentos transgénicos. El rechazo por parte del público a estos cultivos transgénicos culminó en su no adopción en Europa y su omisión de las normas reguladoras de OMGs (organismos genéticamente modificados) en otros países (Razzaq *et al.*, 2019). Por esta razón es fundamental una modificación cultural en apoyo del enfoque genético (Van Tassel *et al.*, 2020).

Por otra parte, que los cultivos editados genéticamente se juzguen en base a directrices con base científica y de forma similar a los programas de mejora convencionales, es la única herramienta para impulsar las aplicaciones de ingeniería genética en la mejora de cultivos (Razzaq *et al.*, 2019).

Como se ha podido comprobar en este trabajo, los sistemas de edición genética brindan nuevas oportunidades para acelerar la domesticación de *novo* de las principales plantas de cultivo de importancia agrícola, ofreciendo la posibilidad de expandir la diversidad de cultivos (Østerberg *et al.*, 2017) y con el objetivo de alimentar de manera sostenible los 10 mil millones de personas que se estiman en el mundo en el año 2050 (Pattnaik *et al.*,

2023). Aunque todavía es necesario un avance notable en la investigación de estos enfoques, la mejora de cultivos acelerada mediante la tecnología CRISPR-Cas ya está demostrando su beneficio, siendo la mejor aproximación para superar los problemas planteados por la globalización.

8. Referencias

- Anders, C., Hoengenaert, L. y Boerjan, W. (2023) "Accelerating wood domestication in forest trees through genome editing: advances and prospects", *Current opinion in plant biology*, 71: 102329. doi:10.1016/j.pbi.2022.102329.
- Arora, L. y Narula, A. (2017) "Gene editing and crop improvement using CRISPR-Cas9 system", *Frontiers in plant science*, 8: 1932. doi:10.3389/FPLS.2017.01932.
- Arruabarrena, A., González Arcos, M., Rubio, L. y Giménez, G. (2015) "Selección asistida por marcadores en el mejoramiento genético del tomate", *Revista INIA*, 40, pp. 43-46.
- Barrientos, M. M., Carranza, R., Cristina, Y. y Pareja, V. (2021) "Estrategias víricas contra el silenciamiento génico en plantas", *Encuentros en la biotecnología*, 14(179), pp. 7-11.
- Begna, T. (2022) "Speed breeding to accelerate crop improvement", *Agricultural science and food technology*, 8(2), pp. 178-186.
- Bhatta, B. P. y Malla, S. (2020) "Improving horticultural crops via CRISPR/Cas9: current successes and prospects", *Plants*, 9: 1360. doi:10.3390/plants9101360.
- Biswas, S., Zhang, D. y Shi, J. (2021) "CRISPR/Cas systems: opportunities and challenges for crop breeding", *Plant cell reports*, 40(6), pp. 979-998.
- Cai, Y., Chen, L., Liu, X., Guo, C., Sun, S., Wu, C., Jiang, B., Han, T. y Hou, W. (2018) "CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of GmFT2a delays flowering time in soya bean", *Plant biotechnology journal*, 16(1), pp. 176-185.
- Chandrasegaran, S. y Carroll, D. (2016) "Origins of programmable nucleases for genome engineering", *Journal of molecular biology*, 428(5), pp. 963-989.
- Chen, K., Wang, Y., Zhang, R., Zhang, H. y Gao, C. (2019) "CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture", *Annual review of plant biology*, 70, pp. 667-697.
- Chiurugwi, T., Kemp, S., Powell, W. y Hickey, L. T. (2019) "Speed breeding orphan crops", *Theoretical and applied genetics*, 132(3), pp. 607-616.
- Denham, T., Barton, H., Castillo, C., Crowther, A., Dotte-Sarout, E., Florin, S. A., Pritchard, J., Barron, A., Zhang, Y. y Fuller, D. Q. (2020) "The domestication syndrome in vegetatively propagated field crops", *Annals of botany*, 125(4), pp. 581-597.
- Dheer, P., Rautela, I., Sharma, V., Dhiman, M., Sharma, A., Sharma, N. y Sharma, M. D. (2020) "Evolution in crop improvement approaches and future prospects of molecular markers to CRISPR/Cas9 system", *Gene*, 753: 144795. doi:10.1016/j.gene.2020.144795.
- Doebley, J. F., Gaut, B. S. y Smith, B. D. (2006) "The molecular genetics of crop domestication", *Cell*, 127(7), pp. 1309-1321.
- Fernie, A. R. y Yan, J. (2019) "De novo domestication: an alternative route toward new crops for the future", *Molecular plant*, 12(5), pp. 615-631.
- Gepts, P. (2002) "A comparison between crop domestication, classical plant breeding, and genetic engineering", *Crop science*, 42(6), pp. 1780-1790.
- Gudi, S., Kumar, P., Singh, S., Tanin, M. J. y Sharma, A. (2022) "Strategies for accelerating genetic gains in crop plants: special focus on speed breeding", *Physiology and molecular biology of plants*, 28(10), pp. 1921-1938.
- Haroon, M., Wang, X., Afzal, R., Zafar, M. M., Idrees, F., Batool, M., Khan, A. S. y Imran, M. (2022) "Novel plant breeding techniques shake hands with cereals to increase production", *Plants*, 11: 1052. doi:10.3390/plants11081052.
- Hickey, L. T., Dieters, M. J., DeLacy, I. H., Kravchuk, O. Y., Mares, D. J. y Banks, P. M. (2009) "Grain dormancy in fixed lines of white-grained wheat (*Triticum aestivum* L.) grown under controlled environmental conditions", *Euphytica*, 168(3), pp. 303-310. doi:10.1007/S10681-009-9929-0.
- Hickey, L. T., N. Hafeez, A., Robinson, H., Jackson, S. A., Leal-Bertioli, S. C. M., Tester, M., Gao, C., Godwin, I. D., Hayes, B. J. y Wulff, B. B. H. (2019) "Breeding crops to feed 10 billion", *Nature biotechnology*, 37(7), pp. 744-754.

- Hua, K., Zhang, J., Botella, J. R., Ma, C., Kong, F., Liu, B. y Zhu, J. K. (2019) "Perspectives on the application of genome-editing technologies in crop breeding", *Molecular plant*, 12(8), pp. 1047-1059.
- Ivarson, E., Ahlman, A., Lager, I. y Zhu, L. H. (2016) "Significant increase of oleic acid level in the wild species *Lepidium campestre* through direct gene silencing", *Plant cell reports*, 35(10), pp. 2055-2063.
- Juma, B. S., Mweu, C., Piero, M. y Mbinda, W. (2021) "CRISPR/Cas genome editing: a frontier for transforming precision cassava breeding", *African journal of biotechnology*, 20(6), pp. 237-250.
- Ku, Y. S., Contador, C. A., Ng, M. S., Yu, J., Chung, G. y Lam, H. M. (2020) "The effects of domestication on secondary metabolite composition in legumes", *Frontiers in genetics*, 11: 581357. doi:10.3389/FGENE.2020.581357/BIBTEX.
- Lemmon, Z. H., Reem, N. T., Dalrymple, J., Soyk, S., Swartwood, K. E., Rodriguez-Leal, D., Van Eck, J. y Lippman, Z. B. (2018) "Rapid improvement of domestication traits in an orphan crop by genome editing", *Nature plants*, 4(10), pp. 766-770.
- Lenser, T. y Theißen, G. (2013) "Molecular mechanisms involved in convergent crop domestication", *Trends in plant science*, 18(12), pp. 704-714.
- Lin, Z., Li, X., Shannon, L. M., Yeh, C. T., Wang, M. L., Bai, G., Peng, Z., Li, J., Trick, H. N., Clemente, T. E., Doebley, J., Schnable, P. S., Tuinstra, M. R., Tesso, T. T., White, F. y Yu, J. (2012) "Parallel domestication of the *Shattering1* genes in cereals", *Nature genetics*, 44(6), pp. 720-724.
- Meyer, R. S. y Purugganan, M. D. (2013) "Evolution of crop species: genetics of domestication and diversification", *Nature reviews genetics*, 14(12), pp. 840-852.
- O'Connor, D. J., Wright, G. C., Dieters, M. J., George, D. L., Hunter, M. N., Tatnell, J. R. y Fleischfresser, D. B. (2013) "Development and application of speed breeding technologies in a commercial peanut breeding program", *Peanut science*, 40(2), pp. 107-114.
- Østerberg, J. T., Xiang, W., Olsen, L. I., Edenbrandt, A. K., Vedel, S. E., Christiansen, A., Landes, X., Andersen, M. M., Pagh, P., Sandøe, P., Nielsen, J., Christensen, S. B., Thorsen, B. J., Kappel, K., Gamborg, C. y Palmgren, M. (2017) "Accelerating the domestication of new crops: feasibility and approaches", *Trends in plant science*, 22(5), pp. 373-384.
- Pandey, S., Singh, A., Parida, S. K. y Prasad, M. (2022) "Combining speed breeding with traditional and genomics-assisted breeding for crop improvement", *Plant breeding*, 141(3), pp. 301-313.
- Pattnaik, D., Avinash, S. P., Panda, S., Bansal, K. C., Chakraborti, M., Kar, M. K., Baig, M. J. y Molla, K. A. (2023) "Accelerating crop domestication through genome editing for sustainable agriculture", *Journal of plant biochemistry and biotechnology*. doi:10.1007/s13562-023-00837-1.
- Quiñones, M. L., Vega, A., Martínez, Y. y Rodríguez, E. (2007) "Estrategias de ingeniería genética para la obtención de plantas transgénicas resistentes a geminivirus", *Revista protección vegetal*, 22(2), pp. 69-79.
- Rai, K. K. (2022) "Integrating speed breeding with artificial intelligence for developing climate-smart crops", *Molecular biology reports*, 49(12), pp. 11385-11402.
- Razzaq, A., Saleem, F., Kanwal, M., Mustafa, G., Yousaf, S., Arshad, H. M. I., Hameed, M. K., Khan, M. S. y KhanJoyia, F. A. (2019) "Modern trends in plant genome editing: an inclusive review of the CRISPR/Cas9 toolbox", *International journal of molecular sciences*, 20: 4045. doi:10.3390/IJMS20164045.
- Razzaq, A., Saleem, F., Wani, S. H., Abdelmohsen, S. A. M., Alyousef, H. A., Abdelbacki, A. M. M., Alkallas, F. H., Tamam, N. y Elansary, H. O. (2021) "De-novo domestication for improving salt tolerance in crops", *Frontiers in plant science*, 12: 681367. doi:10.3389/fpls.2021.681367.
- Shapter, F. M., Cross, M., Ablett, G., Malory, S., Chivers, I. H., King, G. J. y Henry, R. J. (2013) "High-throughput sequencing and mutagenesis to accelerate the domestication of *Microlaena stipoides* as a new food crop", *Plos one*, 8(12). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0082641.
- Sharma, S., Kumar, A., Dhakte, P., Raturi, G., Vishwakarma, G., Barbadikar, K. M., Das, B. K., Shivaraj, S. M., Sonah, H. y Deshmukh, R. (2023) "Speed breeding opportunities and challenges for crop improvement", *Journal of plant growth regulation*, 42(1), pp. 46-59.

- Van Tassel, D. L., Tesdell, O., Schlautman, B., Rubin, M. J., DeHaan, L. R., Crews, T. E. y Streit Krug, A. (2020) "New food crop domestication in the age of gene editing: genetic, agronomic and cultural change remain co-evolutionarily entangled", *Frontiers in plant science*, 11: 524819. doi:10.3389/FPLS.2020.00789/BIBTEX.
- Wanga, M. A., Shimelis, H., Mashilo, J. y Laing, M. D. (2021) "Opportunities and challenges of speed breeding: a review", *Plant breeding*, 140(2), pp. 185-194.
- Watson, A., Ghosh, S., Williams, M. J., Cuddy, W. S., Simmonds, J., Rey, M. D., Asyraf Md Hatta, M., Hinchliffe, A., Steed, A., Reynolds, D., Adamski, N. M., Breakspear, A., Korolev, A., Rayner, T., Dixon, L. E., Riaz, A., Martin, W., Ryan, M., Edwards, D., Batley, J., Raman, H., Carter, J., Rogers, C., Domoney, C., Moore, G., Harwood, W., Nicholson, P., Dieters, M. J., Delacy, I. H., Zhou, J., Uauy, C., Boden, S. A., Park, R. F., Wulff, B. B. H. y Hickey, L. T. (2018) "Speed breeding is a powerful tool to accelerate crop research and breeding", *Nature plants*, 4(1), pp. 23-29.
- Yadav, R. K., Tripathi, M. K., Tiwari, S., Tripathi, N., Asati, R., Chauhan, S., Tiwari, P. N. y Payasi, D. K. (2023) "Genome editing and improvement of abiotic stress tolerance in crop plants", *Life*, 13: 1456. doi:10.3390/LIFE13071456.
- Yaqoob, H., Tariq, A., Bhat, B. A., Bhat, K. A., Nehvi, I. B., Raza, A., Djalovic, I., Prasad, P. V. y Mir, R. A. (2023) "Integrating genomics and genome editing for orphan crop improvement: a bridge between orphan crops and modern agriculture system", *GM crops and food*, 14(1). doi:10.1080/21645698.2022.2146952.
- Ye, M., Peng, Z., Tang, D., Yang, Z., Li, D., Xu, Y., Zhang, C. y Huang, S. (2018) "Generation of self-compatible diploid potato by knockout of S-RNase", *Nature plants*, 4(9), pp. 651-654.
- Yu, H. y Li, J. (2022) "Breeding future crops to feed the world through de novo domestication", *Nature communications*, 13: 1171. doi:10.1038/s41467-022-28732-8.
- 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*, 29, pp. 207-221.
- Zhang, F., Neik, T. X., Thomas, W. J. W. y Batley, J. (2023a) "CRISPR-based genome editing tools: an accelerator in crop breeding for a changing future", *International journal of molecular sciences*, 24: 8623. doi:10.3390/ijms24108623.
- Zhang, J., Yu, H. y Li, J. (2023b) "De novo domestication: retrace the history of agriculture to design future crops", *Current opinion in biotechnology*, 81: 102946. doi:10.1016/j.copbio.2023.102946.
- Zsögön, A., Čermák, T., Naves, E. R., Notini, M. M., Edel, K. H., Weinl, S., Freschi, L., Voytas, D. F., Kudla, J. y Peres, L. E. P. (2018) "De novo domestication of wild tomato using genome editing", *Nature biotechnology*, 36(12), pp. 1211-1216.