

Avances de CRISPR en la producción vegetal

Daniel Guzmán Zapata.

Doctor en Ciencias en Bioprocesos (IPN).

Biotecnología molecular e Ingeniería genética.

Según las predicciones de crecimiento demográfico, dentro de 30 años (2050) seremos casi 10.000 millones de seres humanos habitando el planeta. Uno de los tantos retos que afrontaremos para entonces será alcanzar la seguridad alimentaria para esta población. Este reto es enorme, no solo por el aumento del número de personas que alimentar, sino por los efectos que viviremos del cambio climático, la pérdida de disposición de tierra cultivable por efectos de la urbanización y la contaminación, la escasez en disponibilidad y calidad de agua usada para riego, en las plagas y enfermedades actuales y las que enfrentaremos en los próximos años y en las especies vegetales que se perderán en el transcurso del tiempo (Zaidi et al, 2020). Además, podríamos atestiguar un cambio en la cultura del consumo y de la dieta que tenemos actualmente, donde cada año en el mundo se desperdician 1.3 mil millones de toneladas de comida y alimentos. Desde ahora se han considerado diferentes estrategias para afrontar este reto y estas van desde el desarrollo de maquinaria para tierra e irrigación, fuentes de energía renovables, capacitación de recursos humanos, el aprovechamiento de otras fuentes de proteína y el mejoramiento de cultivos a través de la biotecnología vegetal e ingeniería genética (FAO, 2019).

La herramienta más reciente para realizar este tipo de modificaciones es CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats). Este sistema originalmente de defensa en bacterias y arqueas contra DNAs exógenos (virus y plásmidos), ha sido adaptado biotecnológicamente para modificar el genoma de cualquier organismo. La importancia de esta herramienta yace en su simplicidad, versatilidad y precisión. En los años previos a CRISPR, debía realizarse grandes y complejas construcciones de 30 a 35 polipéptidos (Zinc fingers, TALENs) que se encargan de reconocer la secuencia de DNA a modificar, estos polipéptidos estaban unidos a una enzima de restricción la cual corta de manera no específica el ADN. CRISPR solo consta de dos elementos, una nucleasa y una guía de RNA. La versatilidad de realizar ediciones del genoma ha sido puesta a prueba en diferentes organismos desde bacterias, levaduras, musgos, algas, plantas, células de mamíferos, animales, embriones humanos e incluso en humanos. Más allá de ser unas tijeras moleculares, los sistemas CRISPR han evolucionado para mutar, inhibir, promover, visualizar, corregir, insertar y cambiar la forma en la que veíamos la herencia genética tradicional como el caso de CRISPR Gene-Drive (Guzman-Zapata et al, 2021).

La manipulación genética de las plantas nos permite obtener variedades resistentes a los factores abióticos como temperaturas extremas, sequía, salinidad, presencia de metales en el suelo, cambios de pH, intensidad de luz y radiación UV. También, a los diferentes factores bióticos como insectos, virus, bacterias y hongos (Kaur et al, 2020).

En este breve escrito quisiera enfocarme en 3 estrategias que se han implementado para mejorar la producción vegetal: la modificación en secuencias codificantes, la edición de secuencias no-codificantes reguladoras y los ensayos multiplex en rutas metabólicas.

La modificación de secuencias codificantes permite realizar silenciamientos genéticos, correcciones, inserciones y deleciones. En café, por ejemplo, se ha buscado modificar los genes asociados a la producción de cafeína. El mercado del café fuerte o con alto contenido de cafeína está creciendo, de igual manera, el café descafeinado tiene una alta demanda de usuarios. El descafeinado requiere un proceso que incrementa el uso de agua, solventes, filtros de carbono y un paso de secado que se ve traducido en un aumento en los costos de producción. Otro de los enfoques que se están explorando, es obtener variedades resistentes a las heladas y a plagas propias del cultivo como la roya y la broca.

Algunos trabajos en CRISPR han sido enfocados al estudio de los elementos regulatorios no codificantes como los promotores. Al realizar este tipo de modificaciones, se puede obtener una disminución o incremento en la cantidad del transcrito de un gen. En 2017 Rodriguez-Leal et al, realizaron la edición de la región promotora del gen CLV3 en plantas de tomate, utilizando 8 guías diferentes. Al analizar los fenotipos, encontraron que el número de lóbulos de los frutos había incrementado en las plantas mutantes. De un tomate normalmente de 50 g y dos o 3 lóbulos, encontraron frutos con 7 - 16 lóbulos y pesos entre los 400 - 600 g. Este mismo equipo realizó un trabajo similar en maíz recientemente. En este estudio, modificaron el promotor del gen CLV7 y hallaron un incremento en el número de columnas con granos (Liu et al, 2021). Este tipo de estudios nos podrían ayudar a comprender mejor cómo funcionan los elementos regulatorios en secuencia o elementos CIS y al mismo tiempo cómo manipularlos para generar nuevas variedades con características aprovechables para el consumo.

Los trabajos de modificación de rutas metabólicas usando diferentes sistemas CRISPR (CRISPRa, CRISPRi, CRISPR multiplex) están siendo muy estudiados en organismos que sean fácilmente escalados a nivel industrial. En organismos procariontas destacan *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus subtilis* y en algunos eucariotas como *Saccharomyces cerevisiae*, células HEK293, HeLa, K562 (Zhao et al, 2020). Igualmente, en plantas ha habido algunos avances para la producción de biofármacos. Li et al 2018, reportó un incremento del ácido gamma-aminobutírico (GABA) en frutos y hojas de tomate al realizar una modificación de 5 genes utilizando CRISPR multiplex. Esta tecnología también sería útil en la producción de biocombustibles a partir de especies vegetales que no sean de consumo humano.

Una de estas plantas investigada durante décadas es *Jatropha*, pero debido a su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados dificulta la producción del biodiesel, en la cual, se prefieren ácidos grasos saturados y monoinsaturados. Una de las aproximaciones, es modificar los genes que codifican las enzimas que participan en la biosíntesis de ácidos grasos, entre ellos, los de las familias FAD, KAS y FAE. Estos estudios ya se han realizado en otras especies como canola, soya y maní con resultados alentadores (Subedi et al, 2020).

Los avances que se han realizado para el entendimiento de los elementos que componen el genoma y sus mecanismos de acción han sido notorios en los últimos 20 años. Además, el acceso a nuevos métodos de secuenciación y el análisis de datos a través de herramientas bioinformáticas ha tenido un crecimiento acelerado. Sin embargo, aún existe un vasto universo desconocido en la ciencia, de preguntas que se encuentran sin responder, de elementos por ser descritos parcialmente o en su totalidad, de mecanismos que no se comprenden y un sin fin de otros fenómenos que faltan ser hallados, explicados y buscarles una aplicación. Estará en la nueva promoción de biotecnólogos inspirados en la búsqueda del conocimiento y la apropiación de habilidades, que logremos comprender un poco más el mundo que nos rodea y en ese mismo trayecto transformarlo en algo mejor de lo que lo encontramos, afrontando los diferentes problemas de nuestra generación y tal vez de las futuras. “Es un camino que no transitamos solos y que si logramos ver más lejos es porque hemos subido a hombros de gigantes” (Isaac Newton).

Bibliografía

FAO, Global agriculture towards 2050; Rome 12 and 13 October 2019.

Guzmán-Zapata, D., Vargas-Morales, B. V., & Loyola-Vargas, V. M. (2021). From genome scissors to molecular scalpel: evolution of CRISPR systems. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 37(1): 82-104. doi: 10.1080/02648725.2021.1962071.

Kaur, N., Awasthi, P., & Tiwari, S. (2020). Fruit crops improvement using CRISPR/Cas9 system. En *Genome Engineering via CRISPR-Cas9 System* (pp. 131-145). Academic Press.

Li, R., Li, R., Li, X., Fu, D., Zhu, B., Tian, H., Luo, Y., & Zhu, H. (2018). Multiplexed CRISPR/Cas9 - mediated metabolic engineering of γ - aminobutyric acid levels in *Solanum lycopersicum*. *Plant Biotechnology Journal*, 16(2): 415-427. doi: 10.1111/pbi.12781.

Liu, L., Gallagher, J., Arevalo, E.D., Chen, R., Skopelitis, T., Wu, Q., Bartlett, M. & Jackson, D. (2021). Enhancing grain-yield-related traits by CRISPR-Cas9 promoter editing of maize CLE genes. *Nature Plants*, 7: 287-294. doi: 10.1038/s41477-021-00858-5.

Rodríguez-Leal, D., Lemmon, Z.H., Man, J., Bartlett, M.E., & Lippman, Z.B. (2017). Engineering quantitative trait variation for crop improvement by genome editing. *Cell*, 171(2): 470-480. doi: 10.1016/j.cell.2017.08.030.

Subedi, U., Jayawardhane, K.N., Pan, X., Ozga, J., Chen, G., Foroud, N.A., & Singer, S.D. (2020). The potential of genome editing for improving seed oil content and fatty acid composition in oilseed crops. *Lipids*, 55(5): 495-512. doi: 10.1002/lipd.12249.

Zaidi, S.S.E.A., Mahas, A., Vanderschuren, H., & Mahfouz, M.M. (2020). Engineering crops of the future: CRISPR approaches to develop climate-resilient and disease-resistant plants. *Genome Biology*, 21: 289. doi: 10.1186/s13059-020-02204-y.

Zhao, D., Zhu, X., Sun, N., Wang, T., Bi, C., & Zhang, X. (2020). CRISPR-based metabolic pathway engineering. *Metabolic Engineering*, 63: 148-159. doi: 10.1016/j.ymben.2020.10.004.