



CRISPR/Cas9: una revolución en el fitomejoramiento

Gaona, Karla Vanessa ¹

¹ IDgen: Laboratorio de Diagnóstico Molecular

Correo para correspondencia: karlavvgaona@gmail.com

Resumen

En los últimos años el sistema de repeticiones palindrómicas cortas (CRISPR), se ha convertido en la técnica de fitomejoramiento más innovadora y prometedora debido a su viabilidad y gran precisión para editar genes. La técnica CRISPR/Cas9 fue descubierta en *Streptococcus pyogenes* y se conforma de dos componentes: la endonucleasa Cas9 y el ARN guía de copia única (sgRNA). Con el fin de realizar activación/represión génica y producir plantas no transgénicas mejoradas, la comunidad científica se ha enfocado en estudiar a componentes y procesos de la técnica, tales como: usar diferentes tipos de endonucleasas Cas, potenciar el correcto diseño del sgRNA, identificar nuevos mecanismos de entrega a las células vegetales, utilizar herramientas bioinformáticas como modelos predictivos o de análisis y desarrollar estrategias de identificación simple de mutantes. En Ecuador, la aplicación de sistemas de edición CRISPR se ha empleado en plantas de alto nivel comercial en el Ecuador como rosas y banano. Se espera, que esto permita generar variedades resistentes a enfermedades, satisfacer la demanda de alimentos o mejorar la calidad de cultivos y además, acelerar el progreso de la ciencia básica y fomentar una revolución dentro del fitomejoramiento.

Palabras clave: CRISPR/Cas9, fitomejoramiento, edición génica, prueba de concepto.

Abstract

In recent years, the short palindromic repeat system (CRISPR) has become the most innovative and promising breeding technique due to its feasibility and high precision for gene editing. The CRISPR/Cas9 technique is discovered in *Streptococcus pyogenes* and consists of two components: Cas9 endonuclease and single copy guide RNA (sgRNA). In order to perform gene activation/repression and produce improved non-transgenic plants, the scientific community has focused on studying these elements and processes within the technique, such as: using different types of Cas endonucleases, enhancing the correct design of the sgRNA, identifying new delivery mechanisms to plant cells, using bioinformatics tools as predictive or analysis models and developing simple mutant identification strategies. The application of CRISPR editing systems in plants of high commercial level in Ecuador, such as roses and bananas, will not only allow the generation of disease resistant varieties, satisfy food demand or improve crop quality, but will also accelerate the progress of basic science and create a revolution in plant breeding.

Keywords: CRISPR/Cas9, plant breeding, genic edition, proof of concept.

Artículo

Los genes forman parte de una red compleja dentro de un sistema vivo, para su funcionamiento siguen procesos biológicos (replicación, recombinación, diferenciación, etc.) que

deben comprendidos para desarrollar técnicas de mejoramiento vegetal, cura de enfermedades u otras aplicaciones. La activación y represión de la expresión de los genes son procesos biológicos permanentes, por lo que las técnicas de edición apuntan a trabajar sobre estos procesos para regularlos y dirigirlos para obtener un resultado específico. Gracias al desarrollo revolucionario de la ciencia biológica en las últimas décadas, es posible la modificación del genoma en sitios específicos[1].

El sistema de repeticiones palindrómicas cortas (CRISPR) fue descubierto en *Streptococcus pyogenes* como parte de su sistema inmunológico para protegerse contra virus invasores; y en 2012, surge como una herramienta alternativa de edición del genoma frente a otras tecnologías de nucleasas específicas de secuencia tales como: Nucleasas de dedos de zinc (ZFN) y proteínas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN) [2]. La CRISPR tiene el potencial de modificar o corregir directamente los cambios directamente en un genoma. Por eso se posiciona como una de las técnicas de manipulación/modificación genómica más simples, eficientes y económicas del mercado [3].

Hay dos componentes principales del sistema CRISPR/Cas9: la endonucleasa Cas9 y el ARN de guía única (sgRNA). Ambos, forman un complejo ribonucleoproteico que reconoce y une a cualquier región del genoma gracias a la complementariedad entre el ADN y el sgRNA [4]. La especificidad de unión está determinada por una secuencia de motivo adyacente protoespaciador (PAM) cercana a la secuencia objetivo, es decir, si se produce el reconocimiento entre las secuencias, ADN target y el complejo ribonucleoproteico, Cas9 generará cortes de doble cadena en el ADN entre el tercer y cuarto nucleótidos aguas arriba de PAM [5]. Si la escisión es efectiva, la célula inicia un mecanismo de reparación mediante dos vías: i) la unión de extremos no homólogos (NHEJ) o ii) la reparación dirigida por homología (HDR). La primera es la más común y deriva en inserciones o deleciones tras la unión de extremos de ruptura; además, ordinariamente genera pérdida de función génica. Por otro lado, la vía HDR es un mecanismo de reparación preciso, pues solo se activa si se proporciona un ADN exógeno, lo que podría derivar en organismos transgénicos [6].

El establecimiento del sistema CRISPR/Cas9 en células humanas permitió su aplicación exitosa en células vegetales, siendo la generación de plantas no transgénicas una de las mayores ventajas debido a las estrictas y costosas regulaciones sobre modificación genética. A pesar de que el debate acerca de cultivos editados genéticamente continúa, las plantas libres de transgenes podrían no estar sujetas a estas regulaciones, reduciendo la inversión de tiempo y dinero en su estudio [2].

Otro de los mayores desafíos al trabajar con CRISPR es el diseño, construcción y evaluación del sgRNA debido a que su correcto funcionamiento dependerá de la complementariedad de nucleótidos y, por tanto, el sgRNA debe cumplir criterios de especificidad y eficacia [8]. Existen herramientas computacionales para edición vegetal tales como CRISPR-P, CRISPOR, CRISPRPLANT y CRISPR-GE; que evalúan las guías y analizan posibles efectos fuera de objetivo [5]. Dependerá del investigador y la especie a estudiar su utilización.

CRISPR/Cas9 debe ser entregado a las células vegetales y para ello la tecnología más estudiada es la mediada por *Agrobacterium*; sin embargo, su aplicación genera plantas transgénicas, por lo que han surgido alternativas prometedoras como la entrega mediante proteína ribonucleica (RNP debido a su edición directa de sitios diana sin transgenes, no obstante, su

mejoramiento sigue en auge debido a que la expresión del sistema dentro de la planta es transitoria.

Tuve la oportunidad de aplicar el sistema CRISPR/Cas9 en plantas de alto nivel comercial en el Ecuador, como rosas y banano. Gracias a la práctica, entendí que antes del diseño de edición, es importante realizar una prueba de concepto que valide la técnica para luego ser aplicada en fitomejoramiento. Por lo cual, es recomendable iniciar con la desactivación de un gen marcador que permita detectar mutantes de forma fenotípica [7]. En mi caso, he trabajado con el gen de la enzima fitoeno desaturasa (PDS) en ambas especies logrando su pérdida de función para generar plantas albinas libre de transgenes mediante entrega RNP de CRISPR/Cas9.

CRISPR/Cas9 es una tecnología revolucionaria para la producción de cultivos con características mejoradas. Debido a su simplicidad, versatilidad y eficiencia esta tecnología muy probablemente se extenderá más que las tecnologías de manipulación anteriores, lo cual abre más oportunidades para la comunidad científica de explorar soluciones sostenibles y sustentables en temas como la producción de alimentos.

Referencias

- [1] Tyagi, S.; Choudhary, R.; Das, A.; Won, S. Y.; Shukla, P, CRISPR-Cas9 system: a genome-editing tool with endless possibilities, *Journal of Biotechnology*, nº 319, 2020, 36-53.
- [2] Erpen-Dalla Corte, L.; Mahmoud, L. M.; Moraes, T. S.; Mou, Z.; Grosser, J. W.; Dutt, M., Development of Improved Fruit, Vegetable, and Ornamental Crops Using the CRISPR/Cas9 Genome Editing Technique, *Plants (Basel)*, vol. 8, nº 12, 2019, 601.
- [3] Wada, N.; Ueta, R.; Osakabe, Y.; Osakabe, K., Precision genome editing in plants: state-of-the-art in CRISPR/Cas9-based genome engineering, *BMC Plant Biology*, nº 234, 2020.
- [4] Shan, S.; Soltis, P. S.; Soltis, D. E.; Yang, B., Considerations in adapting CRISPR/Cas9 in nongenetic model plant systems, *Applications in Plant Sciences*, vol. 8, nº 1, 2020.
- [5] Liu, G.; Zhang, Y.; Zhangabd, T., Computational approaches for effective CRISPR guide RNA design and evaluation, *Computational and Structural Biotechnology Journal*, vol. 18, 2020, 35-44.
- [6] Zaidi, S. S.-e.-A.; Mahas, A.; Vanderschuren, H.; Mahfouz, M. M., «Engineering crops of the future: CRISPR approaches to develop climate-resilient and disease-resistant plants, *Genome Biology*, vol. 21, nº 289, 2020.
- [7] Zhu, H.; Li, C.; Gao, C.; Applications of CRISPR-Cas in agriculture and plant biotechnology, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 21, 2020, 661-677.
- [8] Cui, Y.; Xu, J.; Cheng, M.; Liao X.; Peng, S., Review of CRISPR/Cas9 sgRNA Design Tools, *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*, vol. 10, 2018, 455-465.