



# Las nuevas herramientas de edición genómica y la mejora genética de plantas

Josep M. Casacuberta y Pere Puigdomènech

CRAG (CSIC-IRTA-UAB-UB), Barcelona

## MUTACIÓN, SELECCIÓN Y MEJORA GENÉTICA

La mejora genética se ha realizado a través de la historia utilizando el conocimiento científico disponible en cada momento. Así, mientras que durante una buena parte de su historia se realizó de manera empírica, el redescubrimiento de las leyes de la herencia de Mendel y la difusión de las ideas de Darwin sobre la evolución de las especies a principios del siglo XX, dotó de una base teórica suficiente para que la mejora de plantas y animales sufriera una transformación importante. El reconocimiento del valor de la variabilidad genética, la capacidad de predecir el resultado fenotípico de cruzar variedades distintas y la conciencia de la posibilidad de una transformación continua de los fenotipos, supusieron una auténtica revolución que llevó en pocos años a convertir la mejora genética en una disciplina con fuerte carga científica.

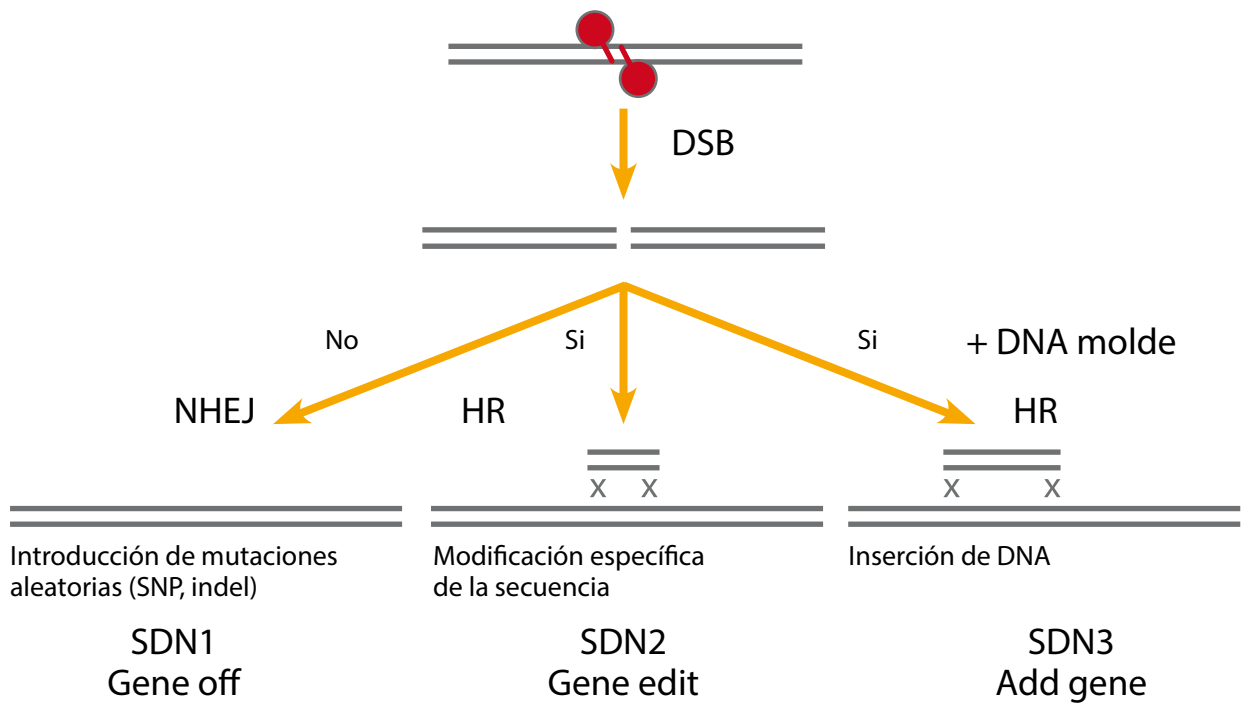
Además de utilizar la variabilidad genética existente, a partir de la segunda mitad del siglo XX la mejora genética de plantas ha utilizado la mutagénesis, química o por radiación, para generar mutaciones nuevas que pudieran dar lugar a nuevos alelos interesantes. De hecho, estas técnicas han tenido un éxito importante y durante los últimos 70 años se han obtenido por mutagénesis más de 3.200 variedades de más de 200 especies (base de datos de la IAEA/FAO, <http://www-infocris.iaea.org/MVD/>). El tipo de mutaciones introducidas por estas técnicas no difiere de las mutaciones espontáneas, puesto que se basan en roturas de la doble cadena de ADN que son reparadas por los mecanismos celulares de la misma forma que se reparan las mutaciones espon-

táneas. De esta manera, aunque un porcentaje elevado de mutaciones son cambios simples de nucleótidos (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs), también se dan duplicaciones génicas, o reorganizaciones cromosómicas más importantes. Todas estas modificaciones se dan de forma esencialmente aleatoria en el genoma y el trabajo de la mejora genética es identificar los caracteres de interés y transferirlos a las variedades que pueden cultivarse.

## NUEVAS TÉCNICAS DE MEJORA GENÉTICA: LA REVOLUCIÓN CONTINÚA

El éxito de la mejora genética de plantas durante el siglo XX ha sido indudable. Además de permitir alimentar una población mundial en continuo crecimiento, ha hecho posible que dispongamos de una variedad de productos con una calidad sin precedentes en la historia de la humanidad. La mejora genética de plantas tiene que seguir incorporando la mejor ciencia disponible para poder obtener plantas más adaptadas a nuestras necesidades. En este sentido, el uso de plantas transgénicas puede dar respuesta a algunos problemas concretos. El cultivo de plantas transgénicas tolerantes a herbicidas o resistentes a plagas ha mostrado hasta qué punto estas técnicas pueden ser útiles. En la actualidad estas plantas representan más del tercio del valor total del mercado de semillas a nivel mundial. Su aplicación en Europa ha chocado con la aprobación de un marco regulatorio complejo que limita su uso.

Durante los casi 20 años transcurridos desde la comercialización del primer producto obtenido de una planta transgénica, la biología, y muy particularmente la genómica vegetal, ha experimentado un avance espectacular. La secuenciación de los genomas de dis-



**Figura 1**

Distintos resultados del uso de SDNs. Después del corte de doble cadena (double strand break, DSB) realizado por un complejo de SDNs (en rojo), en ausencia de un DNA que sirva de molde para la reparación, esta se realizará por “non-homologous end joining” (NHEJ) y se introducirán frecuentemente cambios aleatorios en el sitio de corte (en rojo en el esquema). Esta utilización de las SDNs se conoce como SDN1. Si la reparación se produce en presencia de un DNA molde, la reparación podrá hacerse por recombinación homóloga (HR). En el caso que el DNA molde contenga cambios específicos en la secuencia (en verde en el esquema), éstos se introducirán en el producto final. Esta utilización de las SDNs se conoce como SDN2. Si el DNA molde está formado por una secuencia externa (e.g. un transgén) (en azul en el esquema), flanqueada por secuencias homólogas al sitio de inserción, el resultado de la reparación será la introducción de la secuencia externa en el sitio de corte. Esta utilización de las SDNs se conoce como SDN3.

tintas plantas y la reselección de un buen número de variedades de cada una de ellas está permitiendo obtener una información muy valiosa sobre los alelos que se han seleccionado a lo largo de la historia y que explican algunas de las características de las plantas cultivadas actuales. Pero por otro lado, el avance científico ha permitido desarrollar tecnologías que pueden tener aplicaciones importantes en la mejora genética de plantas. Por todo ello nos encontramos en un momento en el que la mejora genética de plantas puede experimentar un salto cualitativo.

El impacto que estas nuevas tecnologías puede tener en la agricultura ya era evidente hace diez años cuando la Comisión Europea creó un grupo de trabajo para analizar las aplicaciones comerciales de estas nuevas técnicas, sus posibles riesgos para la salud y el medio ambiente y definir un marco regulatorio adecuado. Este grupo de trabajo analizó un conjunto de técnicas diversas que incluían la mutagénesis dirigida por nucleasas específicas (*SiteDirected Nucleases*, SDNs) y que desde entonces se han venido llamando colectivamente como *New Plant Breeding Techniques* (NPBT). Desde entonces se han creado grupos de trabajo en distintos Estados Miembros de la Unión Europea y se han publicado diversos artículos donde se discuten el potencial de estas técnicas y los problemas que pueden plantear su regulación.

### LAS NUEVAS TÉCNICAS DE EDICIÓN GENÓMICA: LA NUEVA FRONTERA

Entre las NPBT destacan por su potencial las nuevas técnicas de mutagénesis y, en particular, las técnicas de edición genómica basadas en nucleasas específicas o SDNs. Las SDNs son nucleasas capaces de cortar la doble cadena del DNA de manera específica en un sitio predefinido del genoma gracias a su capacidad de reconocer secuencias específicas. La reparación del sitio de inserción por los mecanismos celulares resulta frecuentemente en la incorporación de mutaciones en el sitio de corte. De esta manera se pueden obtener mutaciones en sitios específicos del genoma. En presencia de un DNA homólogo que pueda servir de molde, las roturas del DNA se reparan frecuentemente por recombinación homóloga (HR). Por ello si además de la SDN se suministra un DNA molde que incorpore cambios específicos, se incorporarán estos cambios en el sitio de corte y se habrá podido introducir mutaciones bien definidas en sitios específicos del genoma. De la misma forma, se pueden introducir secuencias largas de DNA, por ejemplo un transgén, en el sitio de corte de la SDN si se añaden a ambos lados de la secuencia de interés, secuencias homólogas al sitio de corte. Estas aplicaciones han venido en llamarse SDN1 (mutación aleatoria en un sitio predefinido), SDN2 (mutación específica en un sitio predefinido) y SDN3 (incorporación de una secuencia en un sitio predefinido) (ver *Figura 1*). >>>



>>> Las primeras SDNs que se utilizaron fueron las meganucleasas, un tipo particular de nucleasas naturales codificadas por ciertos intrones móviles que poseen un sitio de reconocimiento de 20-30 bp. Sin embargo, la poca flexibilidad de estas proteínas y la dificultad de modificarlas para reconocer sitios distintos a los naturales ha limitado su aplicación. Esta limitación ha quedado

efectores TAL de *Xantomonas*, unos factores de transcripción que permiten a la bacteria reprogramar específicamente la transcripción de las células de una planta infectada. Estas proteínas reconocen el DNA mediante unos dominios que siguen un código simple entre tres residuos proteicos específicos para cada nucleótido. Es por lo tanto relativamente sencillo construir múltiplos de los dominios proteicos para reconocer virtualmente cualquier secuencia. Sin embargo todas estas SDNs se han visto superadas rápidamente por las CRISPR/Cas. Se trata en este caso de un proceso usado por algunas bacterias para eliminar virus o plásmidos invasivos. El dominio de unión al DNA que dirige a la nucleasa no es en este caso un dominio proteico sino que es un RNA (RNA guía). Esto convierte al sistema CRISPR/Cas en un método altamente flexible y fácil de adaptar con el que se puede cortar específicamente cualquier secuencia sintetizando

**EN LA UNIÓN EUROPEA, existe un sistema específico de aprobación de organismos modificados genéticamente, ya sean plantas o animales, que ha ido incrementando los distintos requerimientos solicitados para su aprobación de forma que cada uno de los eventos aprobados implica gastos de millones de euros.**

superada sucesivamente por nuevos tipos de SDNs, en primer lugar por las *Zinc-Finger Nucleases* (ZFNs), que son proteínas quiméricas compuestas por un dominio de unión al DNA de tipo dedo de zinc y una nucleasa convencional (frecuentemente FokI). Los dominios dedos de zinc interactúan específicamente con un triplete de bases del DNA y su especificidad es conocida, por lo que se pueden diseñar múltiplos de dedos de zinc que reconozcan secuencias específicas. Pero la plasticidad de las ZFNs, aun siendo mucho mayor que la de las meganucleasas, es relativamente limitada y la obtención de ZFNs específicas es costosa, por lo que estas proteínas se vieron rápidamente superadas por un nuevo tipo de SDN, las TALENs. Las *transcription-activator-like* (TAL) *effector nucleases* son proteínas quiméricas entre un dominio nucleasa (de nuevo, frecuentemente FokI) y un dominio de unión al DNA derivado de los

un RNA guía complementario. El enorme potencial de las técnicas de edición genómica basadas en el uso de CRISPR/Cas ha llevado a la revista *Science* a elegirla como el principal avance del año 2015.

En el caso de la mejora genética de plantas, la gran cantidad de nuevos genotipos de plantas de interés agronómico publicados en revistas científicas en los últimos años (*Tabla 1*) muestra el enorme impacto que esta tecnología puede tener en un futuro próximo en el desarrollo de plantas comerciales. Pero además de permitir la obtención de mutantes de una manera dirigida y permitir generar de manera específica nuevos alelos de genes que son responsables de fenotipos conocidos, estas técnicas se pueden usar también para explorar nuevos alelos o nuevas combinaciones de alelos no conocidos. Para que puedan llegar al campo es necesario que estas nuevas metodologías encuentren un marco

**Tabla 1**

**Nuevos genotipos de plantas de interés agronómico publicados en revistas científicas en los últimos años.**

Especies	Modificaciones ADN	Nucleasas	Targets	Referencias
Arroz ( <i>Oryza sativa</i> L.)	Mutación (SDN-1)	TALEN	OsBRI1, OsDEP1	Chen et al., <i>Methods</i> . 69:2-8, 2014
	Mutación (SDN-1)	TALEN	Gen OsSWEET14	Li et al., <i>Nat. Biotechnol.</i> 30, 390–392, 2012
	Mutación (SDN-1)	TALEN	Genes OsDEP1, OsBADH2, OsCCK2, OsSD1	Shan et al., <i>Mol. Plant</i> 6, 1365–1368, 2013
	Mutación (SDN-1)	CRISPR/Cas	Os MPK5	Xie & Yang, <i>Mol. Plant</i> 6, 1975–1983, 2013
	Mutación (SDN-1)	CRISPR/Cas	Genes OsCAO1, OsLAZY1	Miao et al., <i>Cell Res.</i> 23, 1233–1236, 2013
	Mutación (SDN-1)	CRISPR/Cas	Familia de genes OsCDK	Endo et al. <i>in Rice</i> . 1, 1–7, 2014
	Mutación (SDN-1)	CRISPR/Cas	Genes OsSWEET11/14	Jiang et al. <i>Nucleic Acids Res.</i> 41, e188–e188, 2013
	Mutación (SDN-1)	CRISPR/Cas	Genes OsPDS, OsBADH2, Os02g23823, OsMPK2	Shan et al. <i>Nat. Biotechnol.</i> 31, 686–688, 2013
	Mutación (SDN-1)	CRISPR/Cas	Genes OsROC5, OsSPP, OsYSA	Feng et al. <i>Cell Res.</i> 23, 1229–1232, 2013
	Mutación (SDN-1)	CRISPR/Cas	Genes OsPDS, PMS3, EPSPS, DERF1, SH1, MYB5, MYB1, ROC5, SPP, YSA	Zhang et al. <i>Plant Biotechnol. J.</i> 1–11., 2014
	Mutación (SDN-1)	CRISPR/Cas	Genes OsSWEET11/13/1a/1b	Zhou et al. <i>Nucleic Acids Res.</i> 42, 10903–10914, 2014.
	Gran deleción (SDN-1)	CRISPR/Cas	Clusters de genes relacionados con diterpenos de labdano. On Chr 2, 4, 6	Zhou et al. <i>Nucleic Acids Res.</i> 42, 10903–10914, 2014
	Sustitución de genes (SDN-2)	ZFN	Gen IPK1	Shukla et al. <i>Nature</i> 459, 437–441, 2009
	Sustitución de genes (SDN-2)	CRISPR/Cas	Gen PDS	Shan et al. <i>Nat. Biotechnol.</i> 31, 686–688, 2013
Maíz ( <i>Zea mays</i> L.)	Mutación (SDN-1)	Meganucleasa (I-SceI)	Transgén	Yang et al., 2009
	Mutación (SDN-1)	Meganucleasa (I-CreI*)	Secuencia intergénica (adyacente al promotor del gen <i>liguleless 1</i> )	Gao et al. <i>Plant J.</i> 61, 176–187, 2010
	Mutación (SDN-1)	Meganucleasa (I-CreI*)	Gen ZmMS26	Djukanovic et al. <i>Plant J.</i> 76, 888–899, 2010
	Mutación (SDN-1)	TALEN	Genes ZmPDS, ZmIPK1A, ZmIPK, Zm MRP4	Liang et al. <i>J. Genet. Genomics</i> 41, 63–68, 2014
	Mutación (SDN-1)	CRISPR/Cas	Gen ZmIPK	Liang et al. <i>J. Genet. Genomics</i> 41, 63–68, 2014
	Mutación (SDN-1)	CRISPR/Cas	Gen ZmHKT1	Xing et al., 2014
	Inserción gen (SDN-3)	ZFN	TLPs (inserción de tolerancia a los herbicidas AAD1 y genes PAT).	Ainley et al. <i>Plant Biotechnol. J.</i> 11, 1126–1134, 2013

Especies	Modificaciones ADN	Nucleasas	Targets	Referencias
Sorgo ( <i>Sorghum bicolor</i> L.)	Mutación (SDN-1)	CRISPR/Cas	Transgén (DsRED2)	Jiang et al. <i>Nucleic Acids Res.</i> 41, e188–e188, 2013
Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> L.)	Mutación (SDN-1)	TALEN	Gen TaMLO	Wang et al. <i>Nat. Biotechnol.</i> 1–6, 2014
	Mutación (SDN-1)	CRISPR/Cas	Gen TaMLO	Shan et al. <i>Nat. Biotechnol.</i> 31, 686–688, 2013
Cebada ( <i>Hordeum vulgare</i> L.)	Mutación (SDN-1)	TALEN	Gen PAPHy_a	Wendt et al. <i>Plant Mol. Biol.</i> 83, 279–285, 2013
	Mutación (SDN-1)	TALEN	Transgén	Gurushidze et al. <i>PLoS One</i> 9, 1–9, 2014
Brachypodium distachyon L.	Mutación (SDN-1)	TALEN	Genes BdABA1, CKX2, SMC6, SPL, SBP, COI1, RHT, HTA1	Shan et al. <i>Mol. Plant</i> 6, 1365–1368, 2013
Haba de soja ( <i>Glycine max</i> L.)	Mutación (SDN-1)	ZFN	Genes GmDCL1a/b, DCL4a/b, RDR6a, HEN1a, transgén	Curtin et al. <i>Plant Physiol.</i> 156, 466–473, 2011
	Mutación (SDN-1)	TALEN	Genes GmFAD2-1A/B	Haun et al. <i>Plant Biotechnol. J.</i> 1–7., 2014
Algodón ( <i>Gossypium</i> sp.)	Inserción gen (SDN-3)	Meganucleasa (I-CreI*)	Secuencia intergénica, junto a un locus Bt pre-existente (inserción de hppd, epsps)	D'Halluin & Ruitter, <i>Int. J. Dev. Biol.</i> 57, 621–627, 2013
Colza ( <i>Brassica napus</i> L.)	Regulación de expresión génica	Activador viral ZF-VP16	Gen BnKasII	Gupta et al. <i>Plant Biotechnol. J.</i> 10, 783–791, 2012
Tabaco ( <i>Nicotiana tabacum</i> L.)	Reemplazo gen (SDN-2)	ZFN	Genes NtSuRA/B (inserción de alelos mutados confiriendo tolerancia a herbicida)	Townsend et al. <i>Nature</i> 459, 442–445, 2009
	Reemplazo gen (SDN-2)	TALEN	Genes NtSuRA/B (inserción de alelos mutados confiriendo tolerancia a herbicida)	Zhang et al. <i>Plant Physiol.</i> 161, 20–27, 2013
Petunia ( <i>Petunia hybrida</i> Hook.)	Mutación (SDN-1)	ZFN	Transgén	Marton et al. <i>Plant Physiol.</i> 154, 1079–1087, 2010
Manzana ( <i>Malus x domestica</i> Borkh.)	Mutación (SDN-1)	ZFN	Transgén	Peer et al., 2014
Higuera ( <i>Ficus carica</i> L.)	Mutación (SDN-1)	ZFN	Transgén	Peer et al. <i>Planta.</i> 241:941–51, 2015
Naranja dulce ( <i>Citrus sinensis</i> L.)	Mutación (SDN-1)	CRISPR/Cas	Gen CsPDS	Jia et al. <i>PLoS One</i> 9, e93806, 2014

regulatorio apropiado lo que en Europa es ciertamente problemático. Existe en la Unión Europea un sistema de aprobación de organismos modificados genéticamente, ya sean plantas o animales, que ha ido incrementando los requerimientos solicitados para su aprobación de forma que cada uno de los eventos aprobados implica gastos de millones de euros. Este hecho limita de forma radical las solicitudes para la importación o cultivo de organismos modificados. La edición de genomas puede dar lugar a plantas que sean indistinguibles de aquellas que contiene variantes génicas aparecidas de forma espontánea. No parece razonable que los requerimientos exigidos sean los mismos que para las modificaciones que se realizan con construcciones génicas que incluyen nuevas secuencias de origen a veces lejano de la especie transformada. Sin embargo las

regulaciones existentes en Europa se basan en definiciones rígidas, lejanas de consideraciones científicas, algo que ha venido siendo discutido desde diversos foros. La inclusión de todos los tipos de edición genómica dentro de la clasificación GMO puede hacer difícil su uso en Europa.

### BIBLIOGRAFÍA

- Podevin N, Davies HV, Hartung F, Nogué F, and Casacuberta JM, 2013 Site-directed nucleases: a paradigm shift in predictable, knowledge-based plant breeding. *Trends Biotechnol.* 31: 375–83.
- European Academies Science Advisory Council. EASAC (2013). Planting the future: opportunities and challenges for using crop genetic improvement technologies for sustainable agriculture. [http://www.easac.eu/fileadmin/Reports/Planting\\_the\\_Future/EASAC\\_Planting\\_the\\_Future\\_FULL\\_REPORT.pdf](http://www.easac.eu/fileadmin/Reports/Planting_the_Future/EASAC_Planting_the_Future_FULL_REPORT.pdf)