



Edición génica. Conceptos, importancia en la agricultura y aplicación al mejoramiento genético de la soja

H2

Campana 2021/2022

Carla M. L. Rocha; M. Gabriela García y E. Mariano Pardo

Sección Biotecnología.
Instituto de Tecnología Agroindustrial del Noroeste Argentino-
Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres
(ITANOA-EEAOC), mpardokarate@gmail.com.ar

En las últimas décadas la biotecnología ha producido avances significativos en la agricultura, sobre todo debido al uso de herramientas que provienen de la biología molecular, la genómica y la bioinformática. La combinación de la información fenotípica con la genómica puede proveer a los mejoradores el conocimiento para identificar caracteres agrónomicamente importantes y producir más rápidamente cultivares mejorados y mejor adaptados a los nuevos escenarios ambientales (Varshney *et al.*, 2017). Por ejemplo, el mapeo genético de ligamiento, el mapeo por asociación y la selección genómica han producido un impacto relevante en los últimos tiempos en cuanto al desarrollo de nuevas variedades de especies cultivadas (Jannink *et al.*, 2010).

A partir de los años '70 y gracias a los avances en biología molecular e ingeniería genética, se ha potenciado la agricultura e industrias derivadas (Girard y Sztulwark, 2019). Uno de los ejemplos más destacados lo constituyen los cultivos transgénicos que, sin duda, han transformado la industria semillera y de alimentos.

Mediante la transformación genética se han logrado avances significativos en lo que respecta a la generación de cultivos más productivos. En nuestro país, las tecnologías RR y Bt en soja (biotecnologías transgénicas) han marcado un punto de inflexión

sobre la economía nacional y el desarrollo de la agricultura, impulsando al sector productivo de manera directa y a numerosos sectores de manera indirecta (transporte, fabricación de maquinarias agrícolas, alimento de ganado, etc.).

Actualmente, es posible manipular de manera directa la secuencia del ADN de diversos organismos, entre ellos, las plantas cultivadas. La manipulación, modificación o alteración directa de una secuencia de ADN en el genoma de una célula u organismo, ya sea eliminando, insertando o reemplazando alguna secuencia de interés, se logra a través de las técnicas conocidas como "edición génica". Esto tiene grandes implicancias tecnológicas y comerciales, ya que los cultivos mejorados mediante edición no se consideran transgénicos, lo que va en concordancia con las nuevas miradas sociales y exigencias de ciertos mercados (Lacadena, 2017).

■ Los métodos de edición génica

Se conocen desde la década de los '80 tres métodos para editar o cambiar partes del ADN: los dedos de zinc o ZNF, que son nucleasas que contienen un motivo caracterizado por la secuencia de aminoácidos Cys3HisCys4 capaz de unir cationes de zinc; las TALEN (por sus siglas en inglés de Transcription Activator-Like Effector Nuclease, que se traduce como «nucleasa

de actividad similar a un activador de transcripción»); y finalmente CRISPR (Jaganathan *et al.*, 2018), la más moderna y versátil, y en la cual nos centraremos en este artículo debido a sus implicancias en la agricultura y particularmente en la soja.

Los tres se basan en la generación de un corte en las dos hebras de la doble hélice del ADN (llamado corte doble cadena, o Double Strand Break, DSB) realizado en forma precisa y dirigida en la región a editar. Este corte es luego reparado por la célula por dos mecanismos alternativos: i) **reparación no homóloga (RNH)** o unión de extremos no homólogos (cuya sigla en inglés es NHEJ, por Non-Homologous End-Joining); y ii) **reparación homóloga (RH)** (cuya sigla en inglés es HR o HDR, por Homologous Recombination o Homology-Directed Repair) (Jiang y Doudna, 2017). En resumen, primero se corta el ADN en el sitio deseado con una “tijera” molecular programable y luego se utiliza una “plantilla” para reparar el daño e introducir así todos los cambios deseados (Jiang y Doudna, 2017).

Los orígenes de CRISPR

Aunque pueda parecer ciencia ficción, la tecnología CRISPR se descubrió a partir de una curiosidad científica básica estrictamente biológica: la implacable “carrera armamentística” entre las bacterias y los virus que las infectan.

Los «bacteriófagos», las “formas de vida” más abundantes de nuestro planeta, son virus que infectan a las bacterias que evolucionaron para lograr su objetivo de manera eficiente. Poseen estructuras tridimensionales exquisitamente preparadas para acoplarse a la superficie externa de células bacterianas y, una vez adheridas a ellas, inyectan su material genético dentro de la misma. Una vez que el genoma viral se abre camino dentro de la bacteria, secuestra la maquinaria de su huésped para replicar su código genético y replicarse, destruyendo la célula en el proceso. No obstante, las bacterias no se quedan pasivas ante un ataque de tal magnitud. Los investigadores descubrieron con asombro que había secuencias de ADN viral enterradas en el genoma de las bacterias en regiones repetidas de ADN, como si las bacterias hubieran tomado el código genético vírico a manera de memoria molecular. ¿Permitiría esta información reconocer y destruir el ADN viral en el curso de una infección? La respuesta es sí.

Estas regiones recibieron el nombre de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas o CRISPR (en inglés “Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats”). Las mismas son regiones del genoma de las bacterias donde almacenan la información del virus que las atacó en el pasado y que les permite reconocerlo ante una nueva invasión y contrarrestar un ataque futuro (Figura 1).

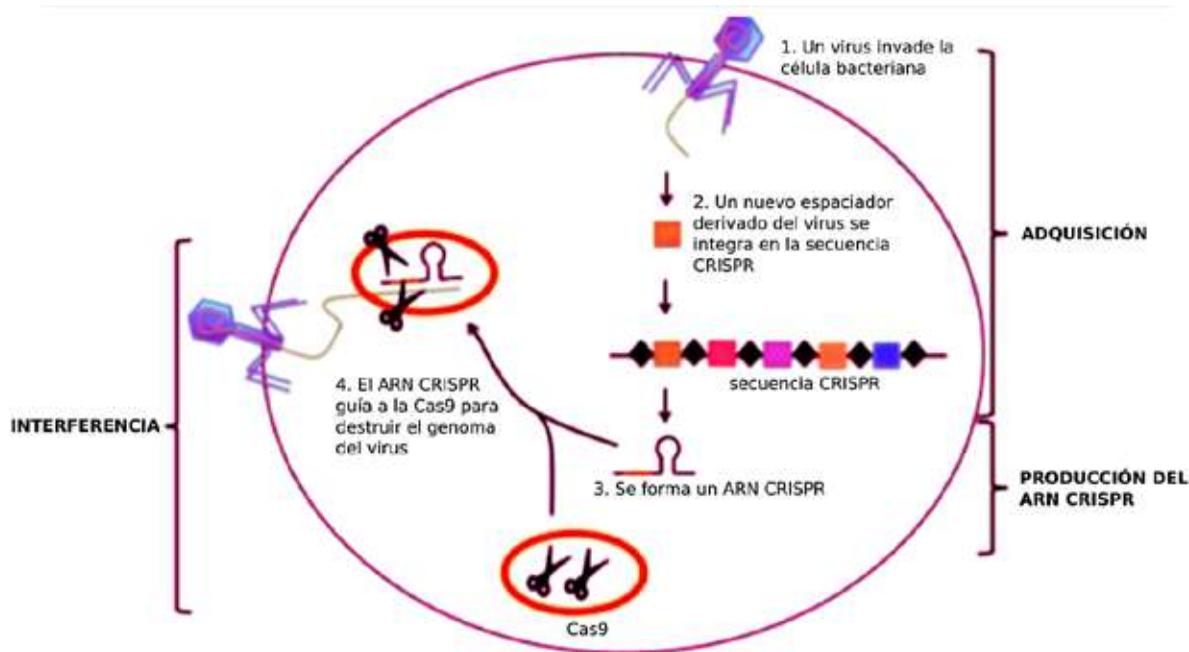


Figura 1. Las tres etapas del sistema inmunitario adaptativo bacteriano CRISPR/Cas: adquisición, producción del ARNcr e interferencia del ADN viral (tomado y adaptado de Fundación Antama).

Como puede verse en la Figura 1, el sistema CRISPR tiene dos componentes independientes: la proteína Cas9, que actúa como tijera, y un pequeño ARN guía, derivado de los espaciadores, que le indica a Cas9 dónde ejercer su acción. Esto les valió a las investigadoras Emmanuelle Charpentier y Jennifer A. Doudna el Premio Nobel de Química 2020 “por el desarrollo de un método para la edición del genoma”. Ambas “descubrieron una de las herramientas más ingeniosas de la tecnología genética: las tijeras genéticas CRISPR/Cas9”, según lo anunció la Real Academia de las Ciencias de Suecia.

Utilización de CRISPR/Cas9 en agricultura

La secuencia guía dentro de los espaciadores CRISPR normalmente corresponde a genomas virales extraños que constituyen la forma de la inmunidad adquirida de las bacterias, pero puede sustituirse fácilmente por una secuencia de interés para dirigir la actividad de la proteína Cas9. En este principio se basa la utilización de esta maquinaria para “editar los genomas”.

En 2012, dos grupos de investigación demostraron que Cas9 purificado, derivado de *Streptococcus thermophilus* o *Streptococcus pyogenes*, se puede

dirigir por una secuencia guía de RNA (sgRNA) para escindir el ADN objetivo *in vitro* (Gasiunas *et al.*, 2012; Jinek *et al.*, 2012). El reconocimiento del objetivo Cas9 requiere tanto una secuencia específica en el ADN objetivo como el emparejamiento de bases de complementariedad ARN-ADN entre la secuencia de ARN guía de 20 nucleótidos y la secuencia de ADN objetivo complementaria (Jinek *et al.*, 2012).

Las roturas de doble cadena de ADN específicas del sitio generadas por Cas9 inducen procesos de reparación de ADN celular endógeno, que pueden explotarse para modificar el genoma. Las rupturas de la doble cadena de ADN generalmente se reparan mediante una de dos vías: reparación homóloga (RH), si la plantilla homóloga está disponible o, de lo contrario, mediante reparación no homóloga (RNH). RNH es un proceso propenso a errores que puede ligar rápidamente los extremos rotos pero generar pequeñas inserciones y deleciones (indels) en sitios específicos, lo que a menudo resulta en la interrupción o anulación (knock-out) de la función de los genes objetivo. Alternativamente, las rupturas pueden repararse a través de RH, que puede recombinar ADN exógeno y usarse para introducir transgenes o la edición precisa del genoma (Figura 2).

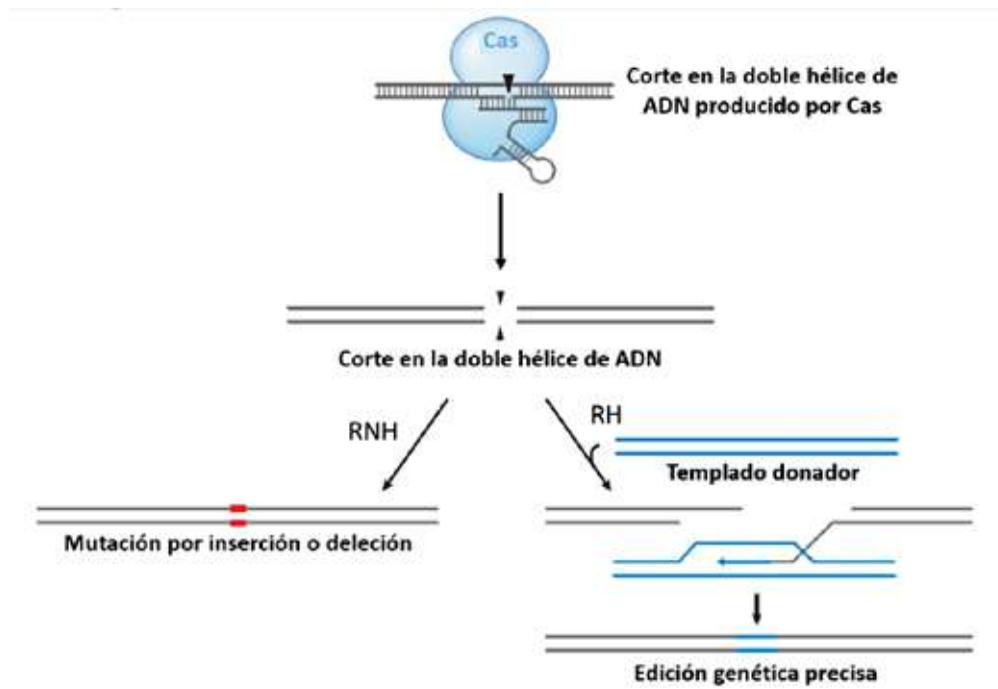


Figura 2. Edición genética mediada por el sistema CRISPR/Cas. La nucleasa Cas introduce cortes precisos en la doble hélice del DNA. Las lesiones genómicas pueden repararse a través de dos vías: El sistema de reparación homólogo (RH) utiliza un templado adicional como donador para la recombinación, reemplazando la secuencia existente con la secuencia modificada de interés. La vía de reparación no homóloga (RNH) une los extremos cortados en un proceso donde pueden insertarse o removerse secuencias de DNA. Las puntas de flecha indican los sitios de corte del DNA. (Modificado de Jiang y Marraffini, 2015).

■ CRISPR/Cas9 en soja - Estado del Arte

La primera planta de soja knock-out dirigida por recombinación homóloga de ADN (RH) fue básicamente una prueba de concepto, es decir, un experimento para verificar que la teoría en cuestión (la edición génica) era susceptible de ser explotada de una manera útil (Li *et al.*, 2015). Posteriormente en 2016, otros investigadores lograron mejorar significativamente la eficiencia de la mutagénesis dirigida en soja mediante CRISPR/Cas9 (Du *et al.*, 2016).

Hoy en día, CRISPR/Cas9 se aplica ampliamente en estudios funcionales de soja mediante knock-out o pérdidas de función. Por ejemplo, en la identificación de los genes que controlan el tiempo de floración, las mutaciones de cambio de marco generadas por CRISPR/Cas9 demostraron que el gen GmFT2a funciona principalmente en días cortos (DC), mientras que GmFT5a tiene efectos más significativos en días largos (DL) (Cai *et al.*, 2018). De manera similar, la desactivación del gen GmPRR37 por el sistema CRISPR sugirió que puede reprimir la floración bajo DL (Wang *et al.*, 2020b). También se utilizó la técnica para demostrar que el gen causal de la esterilidad masculina era el GmMS1 (Fang *et al.*, 2021; Jiang *et al.*, 2021; Nadeem *et al.*, 2021). CRISPR/Cas9 también se aplicó en modificaciones de características relacionadas con el rendimiento y la calidad de la semilla para alterar la arquitectura de la planta mediante la edición de GmLHY (Cheng *et al.*, 2019) o SPL9 (Bao *et al.*, 2019); para aumentar el número de semillas por vaina editando el gen Ln (Cai *et al.*, 2021); para reducir el sabor a frijol eliminando los LOX (Wang *et al.*, 2020a); para aumentar el contenido de isoflavonas editando los genes GmF3H1, GmF3H2 y GmFNSII-1 simultáneamente (Zhang *et al.*, 2020) y para alterar el perfil de ácidos grasos editando FAD2-2 (Al Amin *et al.*, 2019). En el futuro, una mayor aplicación de la edición para un solo gen o para múltiples genes simultáneamente promoverá en gran medida el estudio funcional y el

diseño molecular de la soja mejorada.

En la soja, casi el 75% de los genes se presentan en múltiples copias y la desactivación de un solo gen generalmente no presenta un fenotipo mutante. Es importante desarrollar un sistema CRISPR/Cas9 que pueda editar múltiples genes homólogos en simultáneo. Al optimizar los pasos de construcción de vectores, evaluación de sgRNA, transformación agrupada e identificación de sgRNA, se desarrolló un sistema CRISPR/Cas9 que puede generar mutagénesis multiplex con mayor eficiencia (Bai *et al.*, 2020). En la naturaleza, además de los alelos causados por mutaciones de pérdida de función, gran parte de las variaciones fenotípicas en los rasgos agronómicos son el resultado de variaciones del polimorfismo de un solo nucleótido (SNP). El daño de la función de todo el gen usando el sistema de edición de genes, por lo general, conduce a un fenotipo grave, que puede no ser óptimo para la mejora de las características agronómicas en la producción. Por lo tanto, la generación de mutaciones puntuales en sitios específicos que afectan características agronómicas importantes es de gran valor en el mejoramiento molecular.

■ Conclusión

Se han logrado numerosas mejoras durante las últimas décadas en la producción de soja y en la obtención de mejores variedades. Sin embargo, la población mundial continúa en aumento y surge la necesidad de producir mayores volúmenes bajo mejores condiciones, para responder al cambio climático mediante prácticas agrícolas más sostenibles. La creación de nuevas variedades con caracteres mejorados puede abordarse utilizando nuevas técnicas de mejoramiento genético como CRISPR, para lo cual es necesario comprender no solo la función de genes individuales, sino además, dilucidar las redes génicas. Esta técnica puede promover futuros avances para diseñar y mejorar molecularmente la soja, contemplando un marco de manejo integrado de los cultivos.

Bibliografía citada

- Al Amin, N.; N. Ahmad; N. Wu et al. 2019.** CRISPR-Cas9 mediated targeted disruption of FAD2-2 microsomal omega-6 desaturase in soybean (*Glycine max.*L). *BMC Biotechnol* 19:1–10. <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0501-2>
- Bai, M; J. Yuan; H. Kuang et al. 2020.** Generation of a multiplex mutagenesis population via pooled CRISPR-Cas9 in soya bean. *Plant Biotechnol J* 18:721–731. <https://doi.org/10.1111/pbi.13239>
- Bao, A.; H. Chen; L. Chen et al. 2019.** CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of GmSPL9 genes alters plant architecture in soybean. *BMC Plant Biol* 19:1–12. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1746-6>
- Y. Cai; L. Chen; S. Sun et al. 2018.** CRISPR/Cas9-mediated deletion of large genomic fragments in Soybean. *Int J Mol Sci* 19:.. <https://doi.org/10.3390/ijms19123835>
- Cai, Z; P. Xian; Y. Cheng et al. 2021.** CRISPR/Cas9-mediated gene editing of GmJAGGED1 increased yield in the low-latitude soybean variety Huachun 6. *Plant Biotechnol J* 19:1898–1900. <https://doi.org/10.1111/pbi.13673>
- Cheng, Q; L. Dong; T. Su et al. 2019.** CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of GmLHY genes alters plant height and internode length in soybean. *BMC Plant Biol* 1–11. <https://doi.org/10.21203/rs.2.14148/v3>
- Du, H.; X. Zeng; M. Zhao et al. 2016.** Efficient targeted mutagenesis in soybean by TALENs and CRISPR/Cas9. *J Biotechnol* 217:90–97. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.11.005>
- Fang, X.; X. Sun; X. Yang et al. 2021.** MS1 is essential for male fertility by regulating the microsporocyte cell plate expansion in soybean. *Sci China Life Sci* 64:1533–1545. <https://doi.org/10.1007/s11427-021-1973-0>
- Gasiunas, G.; R. Barrangou; P. Horvath and V. Siksnys. 2012.** Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:2579–2586. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208507109>
- Girard, M. and S. Sztulwark. 2019.** La edición génica y la estructura económica de la agrobiotecnología mundial. Una mirada desde los países adoptantes. 15:11–41
- Jaganathan, D.; K. Ramasamy; G. Sellamuthu et al. 2018.** CRISPR for crop improvement: An update review. *Front Plant Sci* 9:1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00985>
- Jannink, J-L; A. J. Lorenz and H. Iwata. 2010.** Genomic selection in plant breeding: from theory to practice. *Brief Funct Genomics* 9:166–177. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elq001>
- Jiang, B.; L. Chen; C. Yang et al. 2021.** The cloning and CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of a male sterility gene MS1 of soybean. *Plant Biotechnol J* 19:1098–1100. <https://doi.org/10.1111/pbi.13601>
- Jiang, F. and J. A. Doudna. 2017.** CRISPR – Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu Rev Biophys* 46:505–529
- Jiang, W. and L. A. Marraffini. 2015.** CRISPR-Cas: New Tools for Genetic Manipulations from Bacterial Immunity Systems. *Annu Rev Microbiol* 69:209–228. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104441>
- Jinek, M.; K. Chylinski; I. Fonfara et al. 2012.** A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity — Supplementary Materials. 337:816–821
- Lacadena, J-R. 2017.** Edición genómica: ciencia y ética. *Rev Iberoam Bioética* 0:1. <https://doi.org/10.14422/rib.i03.y2017.004>
- Li, Z; Z-B. Liu; A. Xing et al. 2015.** Cas9-guide RNA directed genome editing in soybean. *Plant Physiol* 169:960–970
- Nadeem, M.; A. Chen; H. Hong et al. 2021.** GmMs1 encodes a kinesin-like protein essential for male fertility in soybean (*Glycine max* L.). *J Integr Plant Biol* 63:1054–1064. <https://doi.org/10.1111/jipb.13110>
- Varshney, R. K.; M. Roorkiwal and M. E. Sorrells. 2017.** Genomic selection for crop improvement: An introduction
- Wang, J.; H. Kuang; Z. Zhang et al. 2020a.** Generation of seed lipoxygenase-free soybean using CRISPR-Cas9. *Crop J* 8:432–439. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2019.08.008>
- Wang, L.; S. Sun; T. Wu et al. 2020b.** Natural variation and CRISPR/Cas9-mediated mutation in GmPRR37 affect photoperiodic flowering and contribute to regional adaptation of soybean. *Plant Biotechnol J* 18:1869–1881. <https://doi.org/10.1111/pbi.13346>
- Zhang, P.; H. Du; J. Wang et al. 2020.** Multiplex CRISPR/Cas9-mediated metabolic engineering increases soya bean isoflavone content and resistance to soya bean mosaic virus. *Plant Biotechnol J* 18:1384–1395. <https://doi.org/10.1111/pbi.13302>

 **Acuron[®] Pack**

 **Acuron[®] Uno**

 **AxialPlus[®]**

 **Banvel[®]**

BEKER NT[®]

 **Bicep[®] Pack
Gold**

 **Boundary[®]**

 **Callisto[®]**

 **Cerillo[®]**

 **DualGold[®]**

 **Eddus[®]**

 **Enelan[®]**

 **Flex[®]**

 **Flexstar[®] GT**

 **Gesagard[®] 50**

 **Gesaprim[®] 90 WDG**

 **Gramoxone[®] Super**

 **Peak[®] Pack L**

 **Reglone[®]**

 **Sulfosato[®]
Touchdown**

 **Traspect[®]**

 **Voleris[®]**

 **Vesdua[®]**



**Todas las herramientas
para el control de malezas
en el portafolio más
completo del mercado.**



syngenta.

Para mayor información comuníquese con el Centro de Agrosoluciones Syngenta:
0800-444-4804 | agro.soluciones@syngenta.com | www.syngenta.com.ar

Consiga en su Distribuidor Syngenta todo lo que su cultivo necesita para rendir al máximo.

Peligro: el uso incorrecto de estos productos puede provocar daños a la salud y al ambiente. Lea atentamente las etiquetas.

* y [™] son marca registrada de una compañía del grupo Syngenta.

 **No Malezas**
www.nomalezas.com.ar