

ARTÍCULO DE REVISIÓN I

Griegas, cursivas, negritas, versalitas, súper y subíndices

El sistema CRISPR/Cas, un poderoso aliado en la lucha contra los organismos fitopatógenos

DIEGO LÓPEZ MÁRQUEZ, EDUARDO R. BEJARANO y ANA P. LUNA

Área de Genética
Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga (UMA)
Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC)
Málaga

d1m@uma.es
edu_rodri@uma.es
analuna@uma.es

CV autores (lateral):

DIEGO LÓPEZ-MÁRQUEZ es licenciado en Biología por la Universidad de Málaga. En la actualidad, se encuentra disfrutando de una beca FPU para la realización de la tesis doctoral, en el IHSM-UMA-CSIC, dentro de la línea de investigación "Interacción planta-patógeno". Su trabajo, esta codirigido por el Dr. Eduardo R. Bejarano y la Dra. Carmen R. Beuzón López, y se centra en comprender el papel que juegan algunos pequeños RNA de plantas (miRNA y phasiRNA) en la respuesta de defensa frente a patógenos, empleando para ello el patosistema compuesto por *A. thaliana*-*P. syringae*.

EDUARDO R. BEJARANO es catedrático del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología en la Universidad de Málaga y dirige la línea de investigación "Interacción planta-virus-vector" en el IHSM-UMA-CSIC, utilizando como modelo virus de DNA (geminivirus) transmitidos por la mosca blanca *Bemisia tabaci*. Las principales líneas en las que trabaja son: el papel de las modificaciones postraduccionales en la infección por virus; los mecanismos de supresión de la respuesta a jasmonatos en la transmisión de los geminivirus y los mecanismos de supresión de silenciamiento génico mediado por patógenos.

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Color de fuente: Automático, Sin Resaltar

Con formato: Interlineado: sencillo

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Color de fuente: Automático

38

39 **ANA P. LUNA** es doctora en Biología por la Universidad de Málaga. En la actualidad es
40 investigadora en el HSM-UMA-CSIC, en la línea de investigación dirigida por el Dr.
41 Eduardo R. Bejarano “Interacción planta-virus-vector”, donde se usan como modelo los
42 virus de DNA (geminivirus) transmitidos por la mosca blanca *Bemisia tabaci*. Sus
43 investigaciones se dedican principalmente al estudio de los mecanismos de supresión de
44 silenciamiento génico mediado por virus.

Con formato: Color de fuente: Automático

45

46 ~~Sugerencia de Título breve para cabecera de páginas: CRISPR/Cas contra~~
47 ~~fitopatógenos~~

48 ~~En fondo azul claro, posibles frases a destacar (las frases subrayadas, que ahora~~
49 ~~están en negrita y podrían dejarse sin ella, son demasiado largas para repetir en~~
50 ~~grande)~~

51

52

53 **Introducción**

54 En la última década se han desarrollado varios sistemas para la edición génica, todos
55 ellos basados en el uso de proteínas de unión a secuencias específicas de DNA,
56 denominadas nucleasas específicas de secuencia (SSN): (i) las meganucleasas, (ii) las
57 nucleasas con dedos de zinc (ZFNs, *Zinc-finger nucleases*), (iii) las nucleasas sintéticas
58 (TALENs, *Transcription-activator-like effector nucleases*) y (iv) las proteínas tipo Cas
59 y sus derivados^[1].

Con formato: Color de fuente: Automático

60 Los tres primeros grupos se basan en el diseño de proteínas para reconocer diferentes
61 secuencias de DNA mediante la modificación “a la carta” de la secuencia de
62 aminoácidos de dichas proteínas. **Por otro lado, los sistemas CRISPR/Cas están**
63 **basados en una endonucleasa “programable” guiada por RNA, donde la**
64 **especificidad del sistema viene dada por la complementariedad de secuencia entre**
65 **la molécula de RNA y el DNA diana. La facilidad para diseñar la secuencia del**
66 **RNA guía es la principal ventaja de este sistema.**

Con formato: Sin Resaltar

Con formato: Fuente: Negrita, Sin subrayado

67

68 **DESCUBRIMIENTO CRISPR/Cas COMO SISTEMA INMUNE**

Con formato: Color de fuente: Automático

69 Los microorganismos están expuestos a elementos genéticos invasivos, como fagos o
70 plásmidos. Para defenderse, los microorganismos han desarrollado mecanismos que

71 restringen la entrada o destruyen estos elementos. La eliminación de estos elementos
72 genéticos se puede llevar a cabo mediante sistemas de modificación-restricción o a
73 través del mecanismo de CRISPR/Cas (*Clustered regularly interspaced short*
74 *palindromic repeats*; en español: repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y
75 regularmente interespaciadas). Los sistemas CRISPR/Cas funcionan como un sistema
76 inmune adaptativo (memoria inmunológica), estando presente en el 45 % de las especies
77 de bacterias y en el 84 % de las de arqueas. Su funcionamiento está basado en la
78 presencia en estos organismos de familias de secuencias de DNA que contienen
79 fragmentos de genomas virales. Estos fragmentos son utilizados por la bacteria/arquea
80 para detectar y destruir el DNA del virus y así poder defenderse eficazmente de ellos. El
81 sistema CRISPR/Cas está constituido por un *locus* que contiene repeticiones de DNA
82 parcialmente palindrómicas (23-47 pares de bases, pb) separadas por secuencias
83 espaciadoras (21-72 pb) y por los genes *CAS* (*CRISPR associated genes*), localizados
84 normalmente en regiones cercanas, que codifican proteínas esenciales para el
85 funcionamiento de esta respuesta inmune.

86 Aunque el termino CRISPR se acuñó en el año 2002, los primeros hallazgos
87 relacionados con los sistemas CRISPR se remontan a 1987, cuando se detectaron las
88 repeticiones en el genoma de bacterias Gram negativas. Entre 2005 y 2007 se relacionó
89 a estas secuencias espaciadoras con secuencias presentes en bacteriófagos y plásmidos y
90 se demostró su funcionalidad como sistema de inmunidad adquirida. En 2013 se
91 publicaron los primeros trabajos demostrando la funcionalidad de los sistemas
92 CRISPR/Cas9 como herramientas biotecnológicas para modificar el genoma de células
93 eucarióticas^[2].

94

95 **MODO DE ACCIÓN DEL SISTEMA INMUNE**

96 El funcionamiento de los sistemas CRISPR/Cas se basa en el reconocimiento de los
97 ácidos nucleicos exógenos mediante fragmentos de RNA de secuencia complementaria
98 (crRNA o CRISPR-RNA), lo que permite su degradación mediante la acción de una
99 nucleasa (Cas). El modo de acción de un sistema CRISPR/Cas puede dividirse en tres
100 etapas: adaptación, expresión e interferencia [Figura 1].

101 Durante la fase de **adaptación**, la bacteria o arquea integra fragmentos pequeños de
102 DNA viral o plasmídico entre las repeticiones presentes en los *loci* CRISPR, dando
103 lugar a los espaciadores [Figura 1A]. Posteriormente, en la fase de **expresión** ocurre la

Con formato: Sin Resaltar

Con formato: Sin Resaltar

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Ninguno

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Color de fuente: Automático

104 transcripción y el procesamiento del pre-crRNA, una secuencia de RNA que contiene
105 los espaciadores y parte de las repeticiones [Figura 1B]. Como resultado se forma el
106 crRNA maduro que, mediante su unión a las proteínas Cas, confiere especificidad al
107 sistema para reconocer y eliminar elementos genéticos invasivos en un mecanismo
108 dependiente de secuencia durante la tercera fase, o fase de **interferencia** [Figura 1C]^[1].
109 En algunos de los sistemas, como los CRISPR/Cas tipo II (Cas9), es necesaria además
110 la presencia de otro RNA no codificante conocido como tracrRNA (*trans-activating*
111 CRISPR RNA) que hibrida con las repeticiones del crRNA, siendo dicha hibridación
112 imprescindible para el procesamiento del crRNA, su reconocimiento por Cas y la rotura
113 del DNA diana [Figura 1]. Para que la secuencia complementaria al crRNA en el
114 fragmento diana sea reconocida por el sistema CRISPR, es necesaria la presencia de una
115 secuencia conocida como PAM (*protospacer adjacent motif*) o PFS (*protospacer-*
116 *flanking sequence*) al lado de la secuencia diana del ácido nucleico invasivo. La
117 ausencia del PAM en secuencias de la bacteria evita el procesamiento de su DNA,
118 sirviendo como sistema de reconocimiento de lo “propio”.

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Sin Resaltar

120 **CLASIFICACIÓN DE LOS SISTEMAS CRISPR/Cas**

Con formato: Color de fuente: Automático

121 La secuenciación masiva de genomas ha permitido identificar la existencia de diferentes
122 clases de sistemas CRISPR/Cas. Estos sistemas se clasifican en dos clases dependiendo
123 de la composición del complejo efector que reconoce y corta la secuencia diana: (i) la
124 **clase I**, que incluye los tipos I, III y IV, caracterizados por presentar efectores con
125 subunidades proteicas; y (ii) la **clase II**, donde se encuadran los de tipo II (Cas9), V
126 (Cas12) y VI (Cas13), que constan de un complejo efector formado por una sola
127 proteína con dominios múltiples^[3]. Estos últimos son los sistemas más utilizados para la
128 “edición de genes” (*gene editing*), siendo el sistema basado en Cas9 el más conocido y
129 extendido. En la Figura 2 se muestran las características de los sistemas de clase II
130 utilizados hasta la fecha, indicando la naturaleza de la diana, el tipo de corte que
131 generan y las características de los PAM/PFS que debe contener la secuencia diana.

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Color de fuente: Automático

133 **EL SISTEMA DE EDICIÓN GÉNICA BASADO EN CRISPR/Cas**

Con formato: Color de fuente: Automático

134 La técnica de edición de genes mediante los sistemas CRISPR/Cas se basa en la
135 generación de un crRNA de secuencia complementaria a la secuencia diana, que guía a
136 la nucleasa Cas para que produzca una rotura de doble hebra (*Double-stranded break* or

137 DSB). Para simplificar la técnica, el tracrRNA y el crRNA se pueden fusionar en un
138 RNA quimérico conocido como sgRNA (*single-guided RNA*) [Figura 3A].

Con formato: Color de fuente: Automático

139 Cas9 es la endonucleasa más empleada, aunque en los últimos años se han desarrollado
140 sistemas basados en otras nucleasas de características similares como Cas12a (CpfI) y
141 Cas13a. La Cas9 más usada es una endonucleasa de DNA guiada por RNA aislada de la
142 bacteria *Streptococcus pyogenes* (SpCas9). La endonucleasa tiene una estructura
143 bilobulada, compuesta por un lóbulo con actividad nucleasa (NUC) y otro lóbulo de
144 reconocimiento con estructura de α -helice (REC)^[1]. El lóbulo NUC contiene dos
145 dominios de nucleasa (HNH y RuvC-*like*) y un dominio de interacción con PAM (PI).
146 El dominio HNH lleva a cabo el procesamiento o corte de la cadena de DNA diana
147 (complementaria al sgRNA), mientras que el dominio RuvC-*like* corta la cadena
148 complementaria del DNA. Ambos cortes se producen dentro de la región
149 complementaria DNA-RNA y a tres nucleótidos de la secuencia PAM.

Con formato: Sin Resaltar

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Fuente: Cursiva

Con formato: Color de fuente: Automático

150 A partir de la versión silvestre de la proteína Cas9 se han generado versiones mutantes
151 con características de gran utilidad. Así, la mutación de uno de los dominios de nucleasa
152 produce una proteína Cas9 (nCAs9) que sólo es capaz de producir el corte en una de las
153 cadenas de DNA, mientras que la mutación en ambos dominios de actividad nucleasa
154 produce una proteína Cas9 incapaz de introducir cortes en el DNA (dCAS9), pero que
155 mantiene su capacidad de unión a DNA mediada por RNA.

156 Las DSB en células eucariotas se reparan generalmente mediante dos sistemas: (i)
157 Reparación por recombinación no homologa o unión de extremos (*Non homologous end*
158 *joining repair*, NHEJ); o (ii) Reparación por recombinación homóloga (*Homology-*
159 *directed repair*, HDR)^[1]. Las DSB producidas por la acción de Cas9 atraen a la
160 maquinaria de ambos sistemas de reparación. Una reparación mediante el sistema NHEJ
161 puede llevarse a cabo por dos mecanismos diferentes: (i) la ruta de reparación NHEJ
162 canónica (C-NHEJ), en la que la maquinaria celular vuelve a “pegar” los extremos del
163 DNA roto; o (ii) mediante un mecanismo de NHEJ alternativo (alt-NHEJ) por el cual
164 una cadena de DNA de cada extremo del corte es “recortada” para reparar la lesión.

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Color de fuente: Automático

165 Ambos tipos de reparación NHEJ son propensos a generar mutaciones por inserción o
166 delección (*indels*). La reparación mediada por HDR requiere la presencia de una
167 molécula de DNA con homología que se emplea como molde para llevar a cabo dicha
168 reparación [Figura 3B].

169 **El sistema CRISPR/Cas esta siendo utilizado para generar mutaciones dirigidas en**
170 **los genomas de numerosas especies. Además de las mutaciones *indel* que produce**
171 **la endonucleasa, se han desarrollado protocolos para generar otros tipos de**
172 **mutaciones o modificaciones.** Así se han logrado producir deleciones de mayor
173 tamaño expresando dos sgRNA complementarios de las secuencias que flanquean el
174 fragmento a deleccionar (*dual targeting*). Otra alternativa es la utilización de varios
175 sgRNA para introducir mutaciones en varios genes a la vez. Recientemente se ha
176 conseguido mutar hasta seis receptores de la hormona ABA (familia PYLs) empleando
177 para ello diferentes sgRNA. Además, puesto que la reparación de la rotura puede ocurrir
178 mediante HDR, se pueden llevar a cabo reemplazamientos de fragmentos genómicos
179 mediante la adición al sistema de un DNA donador de interés, que servirá como molde
180 en la reparación HDR. Por ejemplo, se ha realizado la introducción de genes chivatos.

Con formato: Color de fuente: Automático, Sin Resaltar

Con formato: Color de fuente: Automático

181 Aparte de estas modificaciones “clásicas”, que requieren la actividad nucleasa de Cas9,
182 recientemente se han desarrollado otras técnicas basadas en las versiones nCas9 y
183 dCas9 para generar mutaciones puntuales en el DNA que no requieren la formación de
184 DSB. Un ejemplo de esta estrategia es la expresión de nCas9 fusionada a la desaminasa
185 de citosina, una enzima que transforma la citosina en uracilo (conversión de C a T). El
186 uso de esta proteína de fusión permite inducir mutaciones dirigidas de cambio de base.
187 Esta estrategia se ha utilizado para la modificación del genoma de plantas (*Arabidopsis*
188 *thaliana* y *Brassica napus*), pero en este caso el sistema nCas9 está fusionado a una
189 desaminasa de adenosina de *Escherichia coli*, que induce conversiones de A a G.
190 También se han empleado versiones dCas9 fusionadas a activadores y represores
191 transcripcionales para modular la expresión de genes. Incluso se han desarrollado
192 fusiones de dCas9 a proteínas involucradas en procesos epigenéticos, como
193 acetiltransferasas de histonas o trimetilasas de histonas, que producen cambios en la
194 compactación de la cromatina con la consecuente represión o activación de la expresión
195 del gen de interés. Otro ejemplo de la versatilidad del sistema es el empleo de la versión
196 dCas9 fusionada a proteínas fluorescentes para llevar a cabo estudios de movimiento de
197 cromosomas *in vivo*. Por último, el empleo de proteínas Cas capaces de usar como
198 sustrato ssRNA (Cas13a o una modificación de Cas9 denominada RCas9) ha permitido
199 modular la expresión de un gen postranscripcionalmente utilizando el sistema
200 CRISPR/Cas^[4] [Figuras 4 y 2].

Con formato: Color de fuente: Automático, Sin Resaltar

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Color de fuente: Automático, Sin Resaltar

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Color de fuente: Automático

201 EDICIÓN DEL GENOMA DE PLANTAS

202 Aunque los primeros trabajos de edición de genomas basados en CRISPR/Cas se
203 realizaron en células animales, su empleo se ha extendido rápidamente a otros
204 organismos, incluidas numerosas especies de plantas como *A. thaliana*, tomate, arroz,
205 trigo, etc. Su uso en plantas, no obstante, presenta una serie de características y
206 problemas asociados que se deben considerar al diseñar la estrategia de edición:

207 **1. Mutaciones no deseadas.** Uno de los mayores inconvenientes de los sistemas
208 CRISPR/Cas para la edición de genomas es la aparición de mutaciones en genes no
209 deseados (*off-targets*). El reconocimiento entre la secuencia del sgRNA y el DNA diana
210 no requiere un 100 % de complementariedad entre ambas secuencias. Los estudios han
211 mostrado que pueden existir algunos desapareamientos dependiendo del número y la
212 posición de estos, siendo más permisivos los cambios en la zona más distal al motivo
213 PAM. Como consecuencia de estos análisis se han desarrollado numerosas herramientas
214 bioinformáticas (CRISPOR; CRISPR-P 2.0) que permiten el diseño de sgRNA con
215 probabilidades muy bajas de producir mutaciones no deseadas en el genoma. Otra de las
216 causas que puede favorecer la aparición de estas mutaciones, es el empleo de
217 promotores potentes para la expresión de Cas9 y el sgRNA.

218 <http://crispor.tefor.net>

219 <http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/>

221 **2. Quimeras.** Otra de las limitaciones para generar mutantes en plantas mediante el uso
222 de los sistemas CRISPR/Cas es la aparición de individuos quiméricos. Para generar una
223 planta mutante es necesario introducir las construcciones que expresan sgRNA y Cas9
224 en las células vegetales y generar a partir de ellas un organismo transgénico. Durante la
225 regeneración de la planta, la acción sgRNA y Cas9 produce mutaciones en la secuencia
226 diana que puede ser diferentes en cada célula, generando un organismo quimérico. Para
227 obtener una planta mutante genéticamente pura es necesario, por tanto, obtener semillas
228 del transformante original y seleccionar entre la descendencia aquellas plantas que
229 contengan las mutaciones apropiadas.

230 **3. La eliminación del sgRNA/Cas9.** Una vez generada la planta mutante, se ha de
231 eliminar, mediante segregación, el transgén que contiene Cas9 y los sgRNA para evitar
232 la inducción de mutaciones no deseadas y poder utilizar las plantas en ensayos de

Con formato: Color de fuente: Automático, Sin Resaltar

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Color de fuente: Automático

233 complementación genética, necesarios en muchas ocasiones para confirmar el origen de
234 los fenotipos observados en los mutantes. Para facilitar la selección de estas plantas, se
235 han desarrollado vectores para la transformación, que contienen, además de las
236 construcciones para la expresión de Cas9 y los sgRNA, un casete para la expresión de
237 fluoróforos. De esta forma, mediante un retrocruzamiento, es posible identificar entre
238 las plantas segregantes, aquellas que conserven la mutación pero que no contienen
239 transgenes. Para evitar el inconveniente que representa la generación de plantas
240 transgénicas, se están desarrollando protocolos para introducir en la célula complejos
241 proteicos preensamblados sgRNA-Cas9 (RNP).

Con formato: Color de fuente: Automático

243 **USO DE CRISPR/Cas PARA GENERAR RESISTENCIAS A** 244 **PATÓGENOS EN PLANTAS**

245 La generación de resistencia a patógenos mediante el sistema CRISPR/Cas se puede
246 conseguir mediante la inducción de mutaciones en dos tipos de dianas: el genoma del
247 patógeno o genes de la planta implicados en la infección [Figura 5].

Con formato: Color de fuente: Automático

248 **CRISPR/Cas dirigido contra el genoma de los patógenos**

Con formato: Color de fuente: Automático

249 La tecnología disponible limita el uso de esta técnica a la inducción de resistencia a
250 patógenos intracelulares como los virus, cuyo genoma es accesible a la maquinaria
251 enzimática del sistema. Aunque la especificidad por DNA de las proteínas Cas9 ha
252 limitado el uso de esta tecnología a virus de DNA, la identificación reciente de proteínas
253 capaces de reconocer y digerir ssRNA está permitiendo emplear esta estrategia contra
254 virus de RNA.

255 Al igual que ocurre con otras tecnologías desarrolladas para la generación de resistencia
256 mediante la expresión de secuencias de RNA complementarias a las del genoma de los
257 virus (RNA antisentido, RNAi, amiRNA), la eficacia del sistema CRISPR/Cas9
258 requiere el diseño de secuencias complementarias específicas de genes/regiones de los
259 virus esenciales para la infección. **No obstante, es previsible que la estrategia de**
260 **CRISPR/Cas9 sea mucho más efectiva y duradera que las basadas en el**
261 **silenciamiento génico, ya que los patógenos carecen de proteínas que puedan**
262 **interferir en el funcionamiento del sistema CRISPR/Cas9, como ocurre con los**
263 **supresores virales del silenciamiento génico.**

Con formato: Sin Resaltar

Con formato: Color de fuente: Automático

264 Hasta la fecha este sistema se ha empleado con éxito para controlar la infección de
265 varias especies de virus de DNA de la familia *Geminiviridae* en plantas de *Nicotiana*
266 *benthamiana* y *Arabidopsis* usando sgRNA dirigidos contra secuencias codificantes de
267 los virus o contra la región intergénica (IR), que contiene el origen de replicación y los
268 promotores para la expresión de los genes virales. Los resultados obtenidos en los
269 ensayos en laboratorio han sido muy prometedores, obteniéndose una reducción tanto
270 en la replicación como en la acumulación de virus durante la infección. Esta reducción
271 fue significativamente mayor cuando se usaron sgRNA contra zonas de la región
272 intergénica [Figura 5]. Cuando se emplearon sgRNA complementarios de secuencias
273 codificantes se detectaron variantes virales que fueron capaces de replicarse y de
274 generar una infección al inocular nuevas plantas, mientras que los sgRNA dirigidos
275 contra las IR no dieron lugar a la aparición de formas virales viables, siendo las
276 moléculas virales recuperadas incapaces de infectar otras plantas. De esta forma, el uso
277 de sgRNA contra las IR podría ser una solución a uno de los principales problemas
278 asociados al uso de esta estrategia: el incremento en la frecuencia de generación de
279 virus recombinantes como consecuencia de DSB producidas por el sistema
280 CRISPR/Cas que puedan escapar al sistema de resistencia o adquieran mayor capacidad
281 patogénica. Este problema puede ser de especial relevancia en cultivos comerciales
282 donde las infecciones mixtas son muy frecuentes. Otra estrategia para evitar esta
283 posibilidad es la expresión de múltiples sgRNA que tengan como diana el genoma del
284 virus. De esta forma la probabilidad de que las moléculas virales se reparen es muy
285 baja, ya que serían cortadas en varios puntos y como consecuencia, degradadas^[5].

Con formato: Color de fuente: Automático

286 La identificación de enzimas Cas capaces de unirse y cortar moléculas de RNA ha
287 permitido ampliar esta estrategia para el control de virus de RNA. Así mediante
288 expresión de FnCas9 y sgRNA específicos contra el *Cucumber mosaic virus* (CMV) y
289 el *Tobacco mosaic virus* (TMV) en plantas de *Arabidopsis* y *N. benthamiana*, se ha
290 generado resistencia a estos virus, que se ha mantenido activa al menos hasta la
291 generación T6 y que es independiente de la actividad nucleasa de FnCas9, pero
292 dependiente de la unión a RNA. En un segundo ejemplo se ha utilizado Cas13a
293 dirigiendo esta ribonucleasa contra varias regiones del genoma viral de RNA de *Turnip*
294 *mosaic virus* (TuMV) en tabaco.

Con formato: Color de fuente: Automático

295 La generación de plantas resistentes a virus implica la necesidad de expresar de forma
296 continua el sistema CRISPR/Cas9 en la planta, lo que limita el uso de esta tecnología en

297 los países en los que existen recelo al uso de plantas transgénicas. Aunque este
298 problema se podría evitar suministrando a la planta los complejos proteicos
299 preensamblados sgRNA-Cas9, o versiones intermedias, como RNA que codifiquen
300 Cas9 y un RNA representando el sgRNA. Sin embargo, la dificultad de uso de estos
301 sistemas y su alto coste impiden que se pueda convertir en un sistema rutinario en la
302 agricultura^[6,7].

Con formato: Color de fuente: Automático

303 **CRISPR/Cas9 dirigido contra genes de la planta**

Con formato: Color de fuente: Automático

304 **Otra alternativa para generar resistencia a patógenos mediante el sistema**
305 **CRISPR-Cas es inducir mutaciones en genes de la planta implicados en la**
306 **infección. La edición de genes de susceptibilidad o genes S (dianas de efectores de**
307 **patógenos o reguladores negativos de inmunidad) es una buena alternativa, ya que**
308 **son necesarios para una interacción planta-patógeno compatible y permiten**
309 **inducir resistencia a cualquier tipo de patógenos.** La principal limitación de esta
310 estrategia es que muchos de los genes S participan en procesos celulares generales y,
311 por tanto, su modificación puede dar como resultado alteraciones no deseadas en el
312 desarrollo, metabolismo, etc.^[8,4,7].

Con formato: Sin Resaltar

Con formato: Sin Resaltar

Con formato: Sin Resaltar

Con formato: Sin Resaltar

Con formato: Color de fuente: Automático

313 **Resistencia frente a virus**

Con formato: Color de fuente: Automático

314 Los virus dependen de un gran número de factores de la planta para llevar a cabo la
315 infección, lo que hace a estos genes excelentes candidatos para generar resistencia a
316 estos patógenos intracelulares. Un ejemplo de esta estrategia son los factores de inicio
317 de la traducción eucariótica, eIF4E, eIF(iso)4E y eIF4G, cuya modificación por
318 CRISPR/Cas9 en plantas de pepino, de *Arabidopsis* y más recientemente en arroz, han
319 logrado producir resistencia contra varios potivirus y otros virus de RNA^[8]. En todos los
320 casos descritos, la resistencia se mantuvo en las plantas no transgénicas obtenidas
321 mediante retrocruzamiento, sin que se detectaran mutaciones en otros genes, ni
322 alteraciones en la morfología o el desarrollo de las plantas [Figura 54].

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Color de fuente: Automático

323 **Resistencia frente a hongos y bacterias**

Con formato: Color de fuente: Automático

324 Existen varios ejemplos de esta estrategia aplicada a la generación de resistencia a
325 distintos hongos en varias especies de interés agrícola, como tomate, trigo, o arroz

Con formato: Nivel 1, Espacio Después: 5 pto

326 [Figura 5]. En estos estudios se han generado plantas con mutaciones en diversos genes
327 S como *MLO* (*Mildew resistant locus*, *TaEDR1* (*Enhanced disease resistance*) o el
328 factor de transcripción implicado en respuesta a estrés biótico de vid (*VvWRKY52*),
329 obteniéndose resistencia a infecciones por *Phytophthora capsici*, *Blumeria graminis*,
330 *Botrytis cinerea*, *Magnaporthe oryzae*, etc. En la mayoría de los casos, la planta
331 transgénica generada no mostró ningún defecto aparente en su desarrollo, excepto en el
332 caso de las plantas de arroz con una mutación del gen *OsSEC3* (subunidad de un
333 complejo implicado en exocitosis) que a diferencia de las plantas mutadas en el gen
334 *OsERF922* (factor de respuesta a etileno 922) mostraron efectos pleiotrópicos en su
335 fenotipo, entre ellos un menor tamaño de la planta [Figura 5].

Con formato: Color de fuente: Automático

336 Las dificultades para la transformación estable de muchas especies leñosas representan
337 una limitación importante para el uso de CRISPR/Cas en este tipo de plantas. No
338 obstante, se han obtenido algunos resultados mediante transformación transitoria en
339 algunas especies como el cacao, donde se han obtenido hojas más resistentes a
340 *Phytophthora tropicalis* expresando por agroinfiltración los componentes del sistema
341 dirigidos contra el supresor del sistema inmune NPR3 (*Non-Expressor of Pathogenesis*
342 *Related*).

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Sin Resaltar

Con formato: Sin Resaltar

343 Existen pocos ejemplos publicados sobre la aplicación del sistema CRISPR/Cas para
344 producir resistencias contra bacterias fitopatógenas. Se han obtenido plantas de arroz
345 resistentes a varias bacterias del género *Xanthomonas* mutando el gen *OsSWEET13*. El
346 sistema CRISPR/Cas se ha usado también con éxito en leñosas como el pomelo Duncan o
347 el naranjo dulce para producir resistencia a *X. citri*. En ambos casos, se modificó la
348 secuencia promotora del gen *CsLOB1* (*Lateral organ boundaries 1*). Las plantas
349 modificadas mostraron resistencia al patógeno sin que se detectara ningún defecto
350 agronómico. En el caso del manzano, sin embargo, no se ha llegado a regenerar plantas
351 a partir de los protoplastos transformados, aunque se transformaron con éxito
352 protoplastos con RNPs contra varios genes *DIPM* (*DspE-interacting proteins of Malus*)
353 para obtener resistencia frente a *Erwinia amylovora* [Figura 5]^[8].

Con formato: Sin Resaltar

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Color de fuente: Automático

355 **PERSPECTIVAS FUTURAS**

Con formato: Color de fuente: Automático

356 La preocupación sobre el uso de pesticidas y cómo estos afectan al medioambiente y a
357 la salud hace que la protección de cultivos mediante la mejora genética usando el
358 sistema CRISPR/Cas sea una alternativa bastante atractiva. Sin embargo, para que esta

359 posibilidad se convierta en algo real habría que vencer varios obstáculos muy
360 importantes: primero, demostrar que las resistencias a los fitopatógenos obtenidas en los
361 laboratorios se pueden dar en condiciones de campo y se pueden mantener a lo largo del
362 tiempo; y, segundo, y probablemente más difícil que lo anterior, conseguir que la
363 legislación y la opinión pública deje de ver con recelo el uso de la edición de genomas
364 de plantas en la mejora genética.

365
366

367 REFERENCIAS

368 ^[1]Wang, H., La Russa, M. y Qi L. S. (2016). “CRISPR/Cas9 in “Genome Editing and
369 Beyond”. *Annu. Rev. Biochem.* **85**: 227-264.

370 https://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev-biochem-060815-014607?url_ver=Z39.88-2003&rft_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rft_dat=cr_pub%3Dpubmed

374 ^[2]Mojica, F. J. M. y Montoliu, L. (2016). “On the Origin of CRISPR-Cas Technology:
375 From Prokaryotes to Mammals”. *Trends in Microbiology.* **24**: 811-820.

376 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27401123>

379 ^[3]Koonin, E. V., Makarova, K. S. y Zhang, F. (2017). “Diversity, classification and
380 evolution of CRISPR-Cas systems”. *Current Opinion in Microbiology* **37**: 67-78.

381 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5776717/>

384 ^[4]Langner, T., Kamoun, S. y Belhaj, K. (2018). “CRISPR Crops: Plant Genome
385 Editing Toward Disease Resistance”. *Annu. Rev. Phytopathol.* **56**: 479-512.

386 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29975607>

389 ^[5]Zaidi, S. S. *et al.* (2016). “Engineering Plant Immunity: Using CRISPR/Cas9 to
390 Generate Virus Resistance”. *Front. Plant. Sci.* **7**: 364.

391 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5099147/>

394 ^[6]Mahas, A. y Mahfouz, M. (2018). “Engineering virus resistance via CRISPR-Cas
395 systems”. *Curr. Opin. Virol.* **32**: 1-8.

396 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30005359>

399 ^[7]Khatodia, S., Bhatotia, K. y Tuteja, N. (2017). “Development of CRISPR/Cas9
400 mediated virus resistance in agriculturally important crops”. *Bioengineered*, **8**: 274-
401 279.

402 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5470520/>

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Sangría: Izquierda: 0,32 cm,
Interlineado: sencillo

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Color de fuente: Automático

403
404
405 ^[8]Borrelli, V. M. *et al.* (2018). “The Enhancement of Plant Disease Resistance Using
406 CRISPR/Cas9 Technology”. *Front. Plant. Sci.* **9**: 109.
407 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6117396/>

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Color de fuente: Automático

412 413 **FIGURAS**

Con formato: Color de fuente: Automático

414 **Poner en algún sitio:**

415
416 Todas las figuras han sido elaboradas por los autores

417 **Confirmar, o indicar en el pie quién ha elaborado cada una**

Con formato: Color de fuente: Automático

418 **Para simplificar, homogeneizar con las otras revisiones, y que no parezca un paper,**
419 **todas se nombran y numeran como figuras:**

Con formato: Color de fuente: Automático

420 **Figura 1.TIF y JPG, viene de pp (mala resolución), con pie:**

421
422
423 **Figura 1.** Estructura y modo de acción del sistema CRISPR/Cas9. (A) Expresión de
424 los elementos: la proteína Cas9, el pre-crRNA que contiene fragmentos pequeños de
425 DNA exógeno entre las repeticiones y el tracrRNA (*trans-activating* CRISPR
426 RNA). (B) Formación del crRNA (CRISPR RNA) maduro mediante la acción de la
427 RNasa III y su unión al tracrRNA. (C) Reconocimiento de las secuencias
428 complementarias del cr-RNA que debe estar flanqueada por una secuencia conocida
429 como PAM (*protospacer adjacent motif*). **En la figura pone “tracrRNA”; lo**
430 **cambiamos todas las veces por tracrRNA. Se adjunta jpg.**

Comentado [A1]: Perfecto.

Con formato: Color de fuente: Automático

431
432
433 **Tabla 1 en Word, rehacer en Corel, con pie:**

Con formato: Color de fuente: Automático

434
435 **Figura 2.** Características de los sistemas CRISPR/Cas de la clase II caracterizados.
436 PAM, *protospacer adjacent motif*; PFS, *protospacer-flanking sequence*. Entre
437 paréntesis se indican nombres alternativos por los que se conoce a los efectores.
438
439
440

441
442 **Figura 3. TIF y JPG, viene de pp (mala resolución), con pie:**

Con formato: Color de fuente: Automático

443
444 **Figura 3.** (A) La técnica de edición de genes mediante los sistemas CRISPR/Cas se
445 puede simplificar fusionando el tracrRNA y el crRNA en un RNA quimérico
446 conocido como sgRNA (*single-guided RNA*). (B) Cas9 produce roturas de doble
447 cadena (DSB) que se reparan mediante “Reparación por recombinación no
448 homóloga o unión de extremos” (NHEJ) o por “Reparación por recombinación
449 homóloga” (*Homology-directed repair*, HDR). La reparación mediante NEHJ une
450 los extremos del DNA rotos generando mutaciones por inserción o delección (*indels*).
451 La reparación por HDR requiere la presencia de una molécula de DNA con
452 homología.

Con formato: Color de fuente: Automático

453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494

Figura 4. TIF y JPG, viene de pp (mala resolución), con pie:

Figura 4. Desarrollo del sistema CRISPR/Cas para generar otros tipos de mutaciones o modificaciones: **(A)** deleciones extensas expresando dos sgRNA complementarios; **(B)** mutaciones puntuales fusionando la nCas9 a enzimas modificadoras como la desaminasa de citosina; **(C)** cambios en la regulación de la transcripción fusionando dCas9 a factores de transcripción; **(D)** modificaciones en el epigenoma fusionando dCas9 a proteínas involucradas en la metilación del DNA o modificaciones postranscripcionales de las histonas; o **(E)** estudios de movimiento de cromosomas *in vivo* fusionando dCas9 a proteínas fluorescentes.

~~Se han añadido letras para distinguir mejor las modificaciones, y se ha retocado algún error de tecleo. Se adjunta jpg.~~

Con formato: Color de fuente: Automático

~~Tabla 2 en Word, rehacer en Corel; la última columna llevará links que dejen indicados para colocar al final del todo en otra columna adicional. Con pie:~~

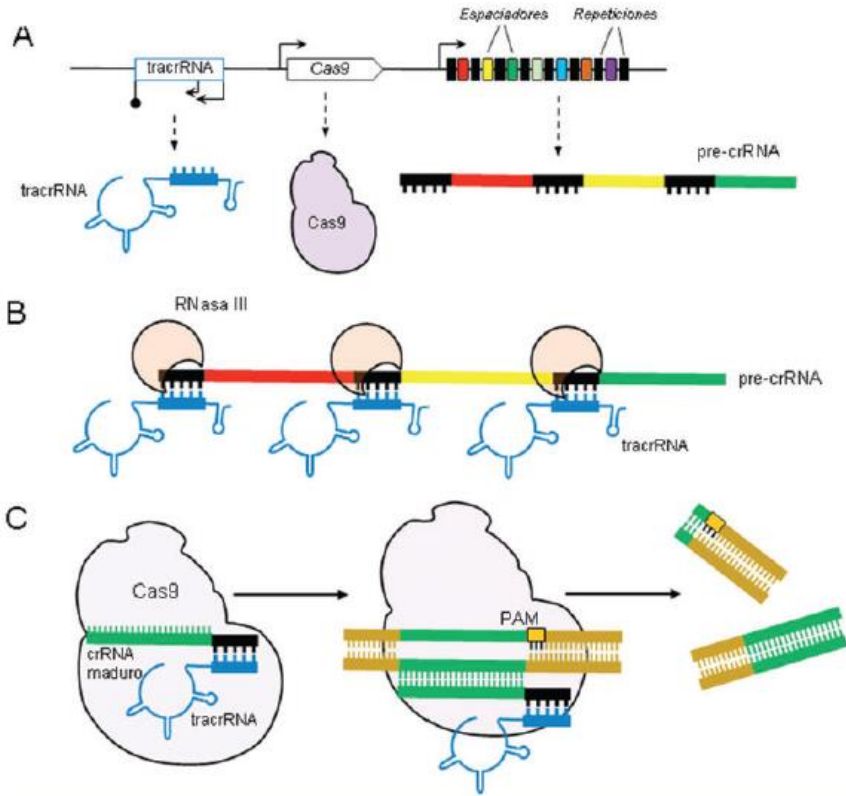
Con formato: Sangría: Izquierda: 0 cm

Con formato: Sangría: Izquierda: 0 cm, Primera línea: 0 cm

Figura 5. Ensayos para la generación de resistencia a patógenos mediante el sistema CRISP/Cas en plantas. ABREVIATURAS: BeYDV: *Bean yellow dwarf virus*; BSCTV: *Beet severe curly top virus*; TYLCV: *Tomato yellow leaf curl virus*; BCTV: *Beet curly top virus*; MeMV: *Merremia mosaic virus*; CLCuKoV: *Cotton leaf curl Kokhran virus*; TYLCSV: *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus*; TuMV: *Turnip mosaic virus*; CMV: *Cucumber mosaic virus*; TMV: *Tobacco mosaic virus*; CVYV: *Cucumber vein yellowing virus*; ZYMV: *Zucchini yellow mosaic*; PRSV-W : *Papaya ring spot mosaic virus-W*; PVX: *Potato virus X*; TCV: *Turnip crinkle virus*; CMV: *Cucumber mosaic virus*; RTSV: *Rice tungro spherical virus*. CP: proteína de la cápside; Rep: *Replication association protein*; IR: Región intergénica; LIR: Región intergénica larga; GFP: Proteína verde fluorescente; HC-Pro: supresor de silenciamiento *Helper component proteinase*; ORF: marco abierto de lectura; UTR: *untranslated terminal repeat*; eIF4E: *eukaryotic translation initiation factor 4E*; eIF4G: *eukaryotic translation initiation factor 4G*; MLO: *Mildew resistant locus*; NPR3: *Non-Expressor of Pathogenesis-Related 3* , ERF: *Ethylene responsive factor*; TaEDR1: *Enhanced disease resistance*; CsLOB: *Lateral Organ Boundaries*; DIPM: *DspE-interacting proteins of Malus*.

~~Los enlaces irán ocultos en cada una de las referencias indicadas. Se adjunta Word con todos ellos.~~

Con formato: Color de fuente: Automático



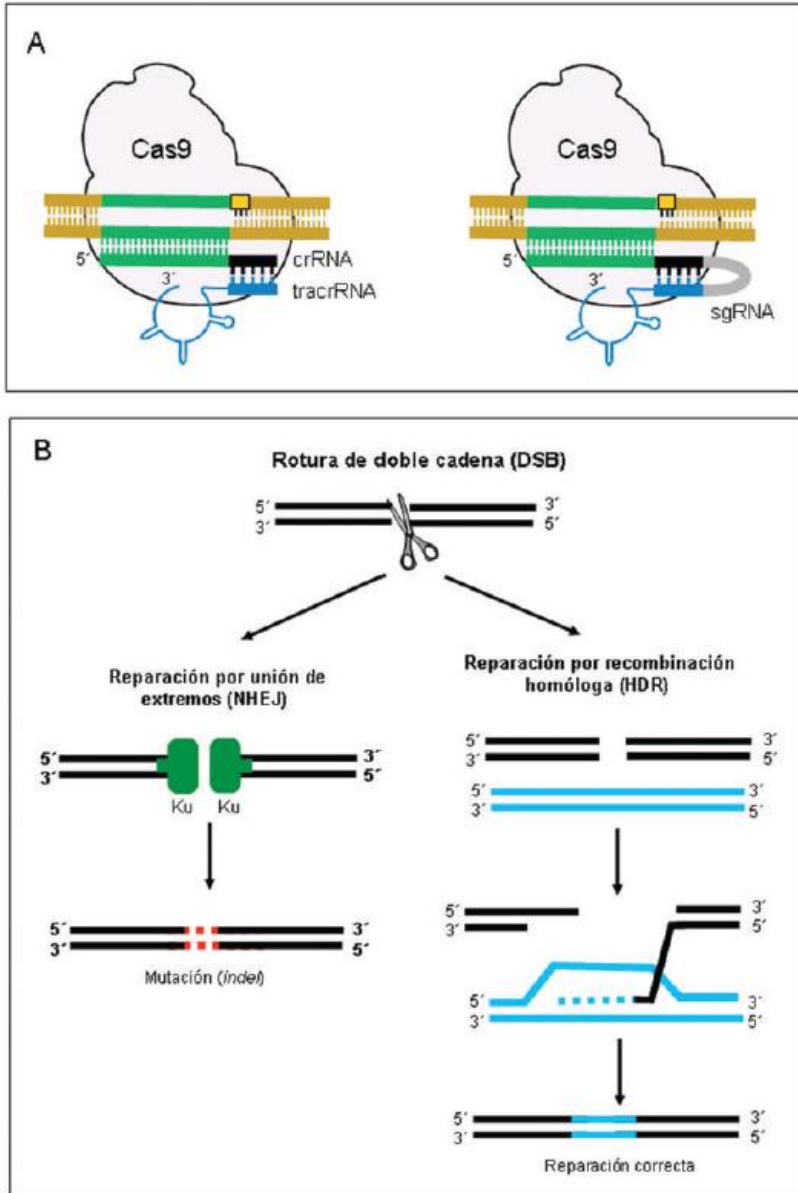
495
496
497

Figura 1

Tipo-Subtipo/efector	Tipo de diana	Estructura del corte	PAM/PFS
II/Cas9	dsDNA	Romo	"3'GC-rich PAM"
V-A/Cas12a(Cpf1)	dsDNA	Cohesivo	"5'AT-rich PAM"
V-B/Cas12b(C2c1)	dsDNA	(5' saliente)	"5'AT-rich PAM"
VI-A/Cas13a(C2c2)	ssRNA	Cohesivo	"3'PFS: non-G"
VI-B/Cas13b	ssRNA	(5' saliente)	"5'PFS: nonC"; "3'PFS:NAN/NNA"

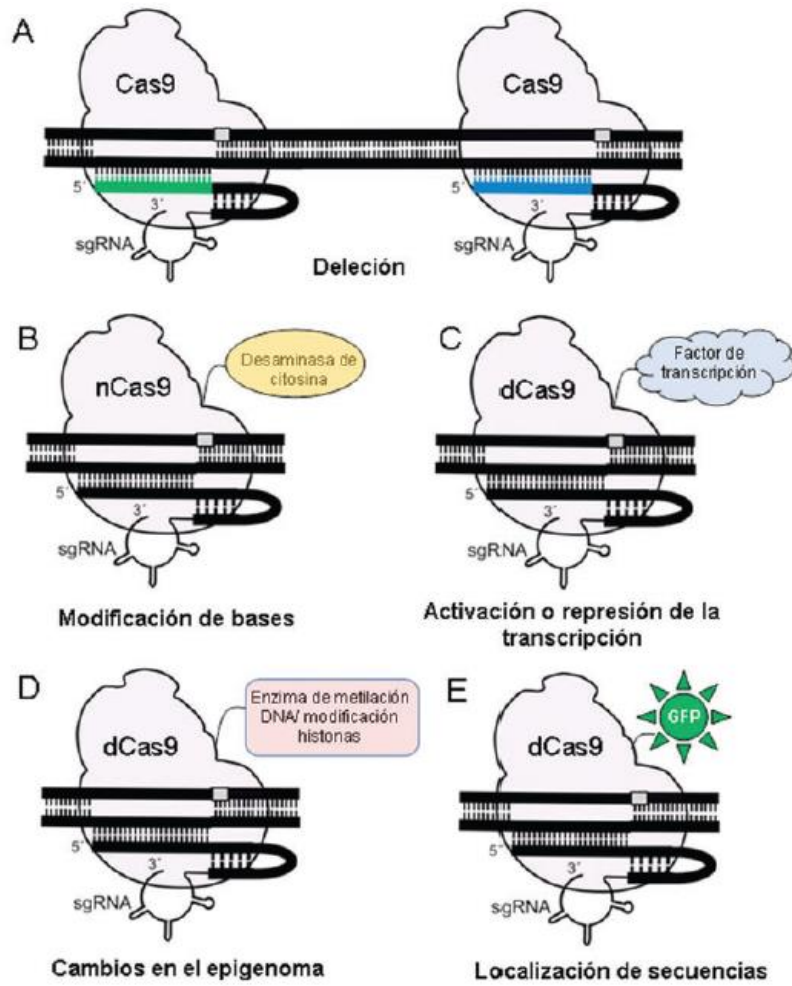
498
499

Figura 2



500
501

Figura 3



502
503

Figura 4

Patógeno	Gen diana	Planta	Referencia
VIRUS			
BSCTV	LIR y Rep/RepA	<i>N. benthamiana</i>	Baltes, N. J. et al. (2015). <i>Nature Plants</i> 1: 15145
TYLCV; BCTV; MeMV	CP, Rep e IR	<i>N. benthamiana</i>	Ali, Z. et al. (2015). <i>Genome Biol.</i> 16: 238
CLCuKoV; MeMV; TYLCV; TYLCSV	CP, Rep e IR	<i>N. benthamiana</i>	Ali, Z. et al. (2016). <i>Sci. Rep.</i> 6: 26912
TuMV	GFP1, GFP2, HC-Pro, CP	<i>N. benthamiana</i>	Aman, R. et al. (2018). <i>Genome Biol.</i> 19: 1
CMV; TMV	ORF1, 2, 3, CP y 3'UTR	<i>N. benthamiana</i> y <i>A. thaliana</i>	Zhang, T. et al. (2018). <i>Plant Biotechnol. J.</i> 16:1415
CVYV, ZYMV, PRSV-W	eIF4E	<i>Cucumis sativa</i>	Chandrasekaran, J. et al. (2016). <i>Mol. Plant Pathol.</i> 17:1140
TuMV	eIF(iso)4E	<i>A. thaliana</i>	Pyott, D. E. et al. (2016). <i>Mol. Plant Pathol.</i> 17: 1276
RTSV	eIF4G	<i>Oryza sativa L. japonica</i>	Macovei, A. et al. (2018). <i>Plant Biotechnol. J.</i> 16:1918
HONGOS			
<i>Blumeria graminis</i>	MLO-A1	<i>Triticum aestivum</i>	Wang, Y. et al. (2014). <i>Nat. Biotechnol.</i> 32: 947
<i>Oidium neolycopersici</i>	MLO1	<i>Solanum lycopersicum</i>	Nekrasov, V. et al. (2017). <i>Sci. Rep.</i> 7: 482
<i>Erysiphe necator</i>	MLO-7	<i>Vitis vinifera</i>	Malnoy, M. et al. (2016). <i>Front. Plant Sci.</i> 7:1904
<i>Borytis cinerea</i>	WRKY52	<i>Vitis vinifera</i>	Wang, X. et al. (2018). <i>Plant Biotechnol. J.</i> 16: 844
<i>Phytophthora tropicalis</i>	NPR3	<i>Theobroma cacao</i>	Fister, A. S. et al. (2018). <i>Front. Plant Sci.</i> 9: 268
<i>Magnaporthe oryzae</i>	ERF922	<i>Oryza sativa L. japonica</i>	Wang, F. et al. (2016). <i>PLoS One.</i> 11: e0154027
<i>Magnaporthe oryzae</i>	SEC3A	<i>Oryza sativa L. japonica</i>	Ma, J. et al. (2018). <i>J. Exp. Bot.</i> 69: 1051
<i>Blumeria graminis</i>	TaEDR1	<i>Triticum aestivum</i>	Zhang, Y. et al. (2017). <i>Plant J.</i> 91: 714
BACTERIAS			
<i>Xanthomonas oryzae</i>	SWEET13	<i>Oryza sativa</i>	Zhou, J. et al. (2015). <i>Plant J.</i> 82: 632
<i>Xanthomonas citri</i>	CsLOB1	<i>Citrus paradisi Macfadyn</i>	Jia, H. et al. (2016). <i>Plant Biotechnol. J.</i> 14: 1291
<i>Xanthomonas citri</i>	CsLOB1	<i>Citrus sinensis Osbeck</i>	Peng, A. et al. (2017). <i>Plant Biotechnol. J.</i> 15: 1509
<i>Erwinia amylovora</i>	DIPM-1; DIPM-2; DIPM-4	<i>Malus domestica</i>	Malnoy, M. et al. (2016). <i>Front. Plant Sci.</i> 7: 1904

Figura 5.

Con formato: Fuente: Sin Negrita