



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO

DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



**“TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DEL TOMATE MICRO-TOM PARA LA ACTIVACIÓN  
DE UN GEN DE DEFENSA VÍA CRISPRa”**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**LICENCIADO EN INGENIERÍA EN AGRONOMÍA**

PRESENTA:

NICOLÁS ALBERTO PRIEGO RANERO

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

DR. CÉSAR MÁRQUEZ QUIROZ

EN CODIRECCIÓN DE:

DR. RAÚL ÁLVAREZ VENEGAS

VILLAHERMOSA, TABASCO, A: 23 DE MAYO DE 2024

## Declaración de Autoría y Originalidad

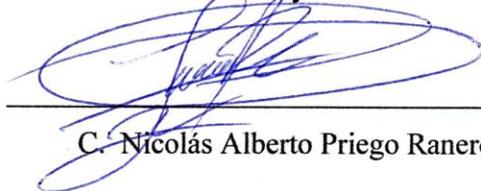
En la Ciudad de Villahermosa, el día 23 del mes de mayo del año 2024, el que suscribe, el C. Nicolás Alberto Priego Ranero, egresado del Programa de Ingeniería en Agronomía con número de matrícula 142C16011 adscrito a la División Académica de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, como autor de la Tesis presentada para la obtención del título de Licenciado en Ingeniería en Agronomía, titulada “TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DEL TOMATE MICRO-TOM PARA LA ACTIVACIÓN DE UN GEN DE DEFENSA VÍA CRISPRa” y dirigida por el Dr. César Márquez Quiroz y el Dr. Raúl Álvarez Venegas.

### DECLARO QUE:

La Tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la LEY FEDERAL DEL DERECHO DE AUTOR (Decreto por el que se reforman y adicionan diversas disposiciones de la Ley Federal del Derecho de Autor del 01 de Julio de 2020 regularizando y aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita. Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad o contenido de la Tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente

Villahermosa, Tabasco a 23 de mayo de 2024.

Nombre y Firma



---

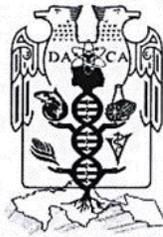
C. Nicolás Alberto Priego Ranero



**UJAT**

UNIVERSIDAD JUÁREZ  
AUTÓNOMA DE TABASCO

" ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE "



División Académica de  
Ciencias Agropecuarias

Coordinación de  
Estudios Terminales



**Asunto:** Autorización de impresión  
de Trabajo Recepcional.  
**Fecha:** 23 de mayo de 2024.

**LIC. MARIBEL VALENCIA THOMPSON**  
**JEFA DEL DEPARTAMENTO DE CERTIFICACIÓN Y**  
**TITULACIÓN DE LA UJAT.**  
**P R E S E N T E**

Por este conducto y de acuerdo a la solicitud correspondiente por parte del interesado(a), informo a usted que con base en el artículo 86 del Reglamento de Titulación Vigente en esta Universidad, la Dirección a mi cargo **autoriza** al (la) **C. Nicolás Alberto Priego Ranero**, con matrícula **142C16011** egresado(a) de la Licenciatura de **Ingeniería en Agronomía** de la División Académica de Ciencias Agropecuarias, **la impresión de su Trabajo Recepcional** bajo la modalidad de **Tesis**, titulado: **"TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DEL TOMATE MICRO-TOM PARA LA ACTIVACIÓN DE UN GEN DE DEFENSA VIA CRISPRa"**.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**

**M.V.Z. JORGE ALFREDO THOMAS TELLEZ**  
**DIRECTOR**

U.J.A.T.  
DIVISIÓN ACADÉMICA DE  
CIENCIAS AGROPECUARIAS  
DIRECCIÓN

C.c.p.- Archivo

Km 25, Carret. Villahermosa-Teapa  
Ra. La Huasteca, 2ª Sección, 86298, Centro, Tabasco, México  
Tel. (+52 993) 3581500 ext. 6614  
Correo electrónico: [terminales.daca@ujat.mx](mailto:terminales.daca@ujat.mx)

[www.ujat.mx](http://www.ujat.mx)

## Carta de Cesión de Derechos

Villahermosa, Tabasco a 23 de mayo de 2024.

Por medio de la presente manifiesto haber colaborado como AUTOR en la producción, creación y/o realización de la obra denominada: “TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DEL TOMATE MICRO-TOM PARA LA ACTIVACIÓN DE UN GEN DE DEFENSA VÍA CRISPRa”.

Con fundamento en el artículo 83 de la Ley Federal del Derecho de Autor y toda vez que, la creación y/o realización de la obra antes mencionada se realizó bajo la comisión de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco; entendemos y aceptamos el alcance del artículo en mención, de que tenemos el derecho al reconocimiento como autores de la obra, y la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco mantendrá en un 100% la titularidad de los derechos patrimoniales por un período de 20 años sobre la obra en la que colaboramos, por lo anterior, cedemos el derecho patrimonial exclusivo en favor de la Universidad.

### COLABORADORES

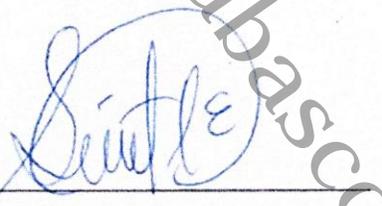


C. Nicolás Alberto Priego Ranero

### TESTIGOS



Dr. César Márquez Quiroz



Dra. Sayani Teresa López Espinosa

# TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DEL TOMATE MICRO-TOM PARA LA ACTIVACIÓN DE UN GEN DE DEFENSA VÍA CRISPRa

INFORME DE ORIGINALIDAD

4%

ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1 [avanceyperspectiva.cinvestav.mx](http://avanceyperspectiva.cinvestav.mx) 480 palabras — 2%  
Internet

2 [gacetajuchiman.ujat.mx](http://gacetajuchiman.ujat.mx) 326 palabras — 2%  
Internet

EXCLUIR CITAS

ACTIVADO

EXCLUIR FUENTES

DESACTIVADO

EXCLUIR BIBLIOGRAFÍA

ACTIVADO

EXCLUIR COINCIDENCIAS < 50 PALABRAS

## Dedicatoria

Con mucho amor, a Norma Angélica Ranero Lara, mi mamá. ¡Que la vida me permita darte aunque sea un poco de lo que tú me has dado sin reparo!

A Juan José Priego Thompson, mi papá, por darme las oportunidades que tu no tuviste. Te quiero mucho, papá.

A Ángel Alexis Priego Ranero, mi querido hermano mayor, por ser un ejemplo de excelencia académica y profesionalismo.

A Nicolás Ranero y María del Carmen Lara, mis abuelos, por enseñarme los valores y el trabajo del campo.

De manera especial y con mucho cariño a Isaura Centurión de la Cruz, mi mejor amiga y también novia. Tu paciencia, amor y compañía fueron el motor que me impulso a concluir esta obra.

## Agradecimientos

A la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (DACA-UJAT), por todos los apoyos brindados a través de sus programas de movilidad académica, verano de investigación científica, estancias y prácticas profesionales, los cuales me permitieron enriquecer mi formación académica dentro y fuera de esta casa de estudios.

Al Dr. Raúl Alvarez Venegas, por haberme otorgado la oportunidad de formar parte de su laboratorio, así como por brindarme su orientación, dirección y todos los recursos necesarios (a través del proyecto Ciencia de Frontera 2019 #6360, financiado por el CONAHCYT) para la elaboración de esta tesis.

Al Dr. César Márquez Quiroz, por aceptar coordinar este trabajo tesis en la UJAT, así como por haberme brindado asesoría, transporte y un espacio dentro de la universidad durante mi tiempo como estudiante y tesista de licenciatura.

A la comisión revisora de este proyecto conformada por los profesores Dr. Efraín de la Cruz Lázaro, Dra. Hortensia Brito Vega, Mtro. José Manuel Salaya Domínguez, Dr. Rodolfo Osorio Osorio y Dr. Edmundo Gómez Méndez, quienes además de revisar y orientarme durante la redacción de este trabajo, me formaron como un profesionista en el salón de clases.

A mis compañeros del Cinvestav: Orlando Camargo, Evelia Coss, Keren Martínez, Armando Díaz, Gabriela Cabrales, Julio Massange, Dalia Duran, ente otros, por brindarme un sentido de pertenencia durante mi estancia en Irapuato. En especial, a mi buen amigo Jesús Gilberto López Carrillo, por su compañía en tantos viajes.

A aquellos docentes y personal administrativo de la UJAT que me brindaron un trato igualitario y que han dedicado su vida al servicio de la universidad.

De manera especial, quiero expresar mi agradecimiento a los profesores Rene Estrada y Nelly Ortiz, mis primeros maestros, quienes a través de sus enseñanzas en el deporte del Taekwondo forjaron en mí el carácter del esfuerzo y la perseverancia, cualidades que me han servido para enfrentar los retos personales y profesionales a lo largo de mi formación académica.

## **Agradecimiento Especial**

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Cromatina y Epigenética, del Departamento de Ingeniería Genética, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Unidad Irapuato, bajo la supervisión del Dr. Raúl Álvarez Venegas y con el respaldo del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) a través del proyecto FORDECYT-PRONACES/6360/2020 titulado “Targeted epigenome editing in tomato via CRISPR/dCas for activation of plant defense genes against pathogens, and the assessment of the microbiome by next-generation sequencing coupled with metagenomic analysis to study the microbial community structures in edited plants”, siendo el responsable técnico del mismo el Dr. Raúl Álvarez Venegas.

## Índice de Contenido

Índice de Figuras.....	x
Título.....	xi
Resumen.....	xi
Abstract.....	xii
Palabras Clave.....	xii
I. Introducción.....	1
II. Marco Teórico.....	5
2.1 La urgencia de un nuevo enfoque en la protección de cultivos.....	5
2.2 Edición genómica.....	10
2.2.1 Mecanismos de edición genómica.....	10
2.2.2 Herramientas de edición genómica.....	11
2.3 CRISPR/Cas: del sistema inmunitario adaptativo en procariontes a la edición de genomas.....	13
2.3.1 Clasificación de los sistemas CRISPR/Cas.....	14
2.3.2 El sistema CRISPR/Cas tipo II.....	15
2.3.3 El sistema CRISPR/Cas9 como herramienta de edición genómica.....	16
2.4 Más allá del “corta y pega”: el sistema CRISPR/dCas9.....	17
2.4.1 El sistema CRISPRa.....	19
2.5 Aplicaciones del sistema CRISPRa en el desarrollo de cultivos agrícolas resistentes al estrés biótico.....	22
2.5.1 Develando los mecanismos epigenéticos del <i>priming</i> en la defensa vegetal.....	24
2.5.2 Hacia el mejoramiento epigenético de la defensa en plantas contra patógenos vía CRISPRa.....	25
2.5.3 En búsqueda de la inmunidad: efecto sinérgico de la edición epigenética y el <i>priming</i> en la defensa vegetal.....	26
2.5.4 Regulación de las comunidades microbianas.....	29
2.6 Genes asociados a la inmunidad y reguladores epigenéticos.....	30
2.6.1 PR-1.....	31
2.6.2 ATX1-SET.....	31
2.7 El tomate como organismo modelo.....	32

III. Justificación .....	36
IV. Pregunta de Investigación.....	37
V. Hipótesis o Supuesto.....	38
VI. Objetivo General y Específico.....	39
VIII. Métodos.....	40
8.1 Ubicación .....	40
8.2 Composición y elaboración de medios.....	40
8.3 Material biológico .....	41
8.3.1 Desinfección de semillas .....	41
8.3.2 Germinación .....	42
8.4 Vectores CRISPRa .....	44
8.5 Líneas de <i>A. tumefaciens</i> .....	45
8.5.1 Cultivo de <i>A. tumefaciens</i> .....	46
8.5.2 Inoculación y co-cultivo.....	46
8.6 Transformación transitoria.....	47
8.7 Transformación estable .....	48
8.7.1 Inducción de brotes.....	48
8.7.2 Elongación de brotes y enraizamiento.....	49
8.7.3 Aclimatación de plantas regeneradas .....	50
8.7.4 Obtención, clasificación y almacenamiento de semillas provenientes de plantas regeneradas <i>in vitro</i> .....	50
IX. Resultados.....	51
9.1 Generación de líneas de <i>A. tumefaciens</i> portadoras de los vectores CRISPRa.....	51
9.2 Efecto de la transformación transitoria sobre los explantes cotiledonares.....	51
9.3 Cultivo <i>in vitro</i> y transformación genética del tomate Micro-Tom .....	52
X. Discusión.....	59
XI. Conclusiones y Recomendaciones.....	64
XII. Referencias citadas .....	69
XIII. Anexos .....	92
13.1 Ilustración del cultivo <i>in vitro</i> y la transformación genética del tomate cv. Micro-Tom ..	93
13.2 Documentos originados a partir de esta investigación .....	92

## Índice de Figuras

Figura 1. Aspersión de pesticidas a los frutos de banano ( <i>Musa paradisiaca</i> variedad Cavendish) en una plantación comercial en Teapa, Tabasco, México.....	8
Figura 2. Aplicaciones del sistema CRISPRa en la protección sostenible de cultivos: estrategias basadas en la inducción química, biológica y mineral del <i>priming</i> .....	29
Figura 3. Transformación genética del tomate cv. Micro-Tom para la activación transcripcional de genes endógenos asociados a la defensa en plantas vía CRISPRa .....	35
Figura 4. Planta de tomate ( <i>S. lycopersicum</i> L.) cv. Micro-Tom.....	42
Figura 5. Obtención de explantes de cotiledón e hipocótilo .....	44
Figura 6. Vectores CRISPRa .....	45
Figura 7. Explantes cotiledonares a los 8, 16 y 24 días posteriores a la infección (DPI) con <i>Agrobacterium</i> .....	53
Figura 8. Inducción de la organogénesis indirecta.....	54
Figura 9. Diferencias fenotípicas observadas entre las líneas transgénicas transformadas con los vectores ST4 y M12 .....	56
Figura 10. Embriogénesis somática del cultivo de tomate cv. Micro-Tom.....	58
Figura 11. Proceso de injertado y segregación de transgenes a partir de plantas editadas vía CRISPRa.....	68
Figura 12. Descripción ilustrativa del proceso de cultivo <i>in vitro</i> y transformación genética del tomate cv. Micro-Tom .....	93

**Título:** Transformación genética del tomate Micro-Tom para la activación de un gen de defensa vía CRISPRa.

**Resumen:** Debido a las limitaciones ambientales y a la evolución continua de plagas y enfermedades agrícolas, se necesitan nuevas estrategias de protección de cultivos que permitan suministrar alimentos suficientes, nutritivos e inoctrinos a una población global en constante crecimiento. En plantas, las herramientas de regulación transcripcional y de edición epigenética basadas en el sistema CRISPRa ofrecen estrategias versátiles y reversibles para el mejoramiento de la resistencia a enfermedades compatibles con estos objetivos. Sin embargo, pese a su potencial en la agricultura, la aplicación del sistema CRISPRa ha estado restringido a plantas modelo con escasos rasgos de interés agronómico. Una alternativa a las plantas modelo convencionales es el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Particularmente, el cultivar de tomate Micro-Tom posee propiedades genéticas y hortícolas que lo constituyen como un modelo atractivo para el estudio del sistema CRISPRa *in vivo*. En el presente estudio, se reporta la integración del sistema CRISPRa para la activación transcripcional y reprogramación epigenética del gen *PR-1* en el tomate Micro-Tom. La generación de plantas editadas se produjo a partir de la transformación estable de hipocótilos con *Agrobacterium*. Estas plantas demostraron ser resistentes a higromicina y se desarrollaron a partir de estructuras organogénicas y embrionarias. Adicionalmente, se implementó un método de transformación transitoria en explantes cotiledonares como alternativa al método de agroinfiltración sin que se presentaran efectos adversos asociados a la inoculación con *Agrobacterium*. Este trabajo representa un avance en la aplicación del sistema CRISPRa para el mejoramiento de la resistencia a fitopatógenos en plantas de importancia agrícola.

**Abstract:** Due to environmental constraints and the continuous evolution of agricultural pests and diseases, we need new crop protection strategies to supply sufficient, nutritious, and safe food for an ever-growing global population. In plants, CRISPRa-based transcriptional regulation and epigenetic editing tools offer versatile and reversible strategies for disease resistance enhancement compatible with these goals. However, despite its potential in agriculture, the application of the CRISPRa system has been restricted to model plants with few traits of agronomic interest. An alternative to conventional model plants is tomato (*Solanum lycopersicum* L.). In particular, the Micro-Tom tomato variety exhibits genetic and horticultural traits, making it an attractive model for studying the CRISPRa system *in vivo*. Here, we report the integration of the CRISPRa system for transcriptional activation and epigenetic reprogramming of the *PR-1* gene in Micro-Tom tomato plants. We achieved the generation of edited plants by stably transforming hypocotyl explants with *Agrobacterium*. These plants were resistant to hygromycin and developed from organogenic and embryonic structures. Additionally, we implemented a transient transformation method in cotyledonary explants as an alternative to the agroinfiltration method without adverse effects associated with *Agrobacterium* inoculation. This work represents an advancement in implementing the CRISPRa system for disease resistance improvement in plants of agronomic importance.

**Palabras Clave:** *SIPR-1*, CRISPRa, transformación genética, cultivo *in vitro*, protección de cultivos.

## **I. Introducción**

En años recientes, diversas nucleasas programables han sido introducidas como novedosas herramientas de edición genómica, cuyas capacidades de edición poseen un control, precisión y aplicabilidad sin precedentes. Particularmente, ha sido revolucionaria la simplicidad con la que se puede programar al sistema de repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas asociado a la proteína Cas9 (CRISPR/Cas9) para introducir modificaciones genéticas de interés en el genoma de una amplia gama de organismos y tipos de células (Jinek et al. 2012). En la última década, el sistema CRISPR/Cas9 ha permitido introducir modificaciones genéticas puntuales en el genoma de una amplia gama de organismos, ampliando drásticamente el catálogo de organismos modelo genéticamente manipulables (Wang y Doudna, 2023). En la actualidad, sin embargo, sus aplicaciones no están limitadas a la capacidad de efectuar cambios en el ADN. En lugar de alterar de manera irreversible la información genómica, por ejemplo, la fusión de dominios autónomos de activación o represión transcripcional en cualquiera de los extremos terminales de la proteína Cas9 catalíticamente inactiva (dCas9) ha generado un paquete de herramientas regulatorias, tanto para activar como para reprimir secuencias genómicas de interés de forma precisa (Gilbert et al. 2014; Qi et al. 2013). En especial, la fusión de activadores transcripcionales y/o efectores epigenéticos asociados a estados transcripcionalmente activos de la cromatina constituyen un poderoso mecanismo para la activación deliberada y reversible de la expresión génica: el sistema de activación transcripcional inducida mediante CRISPR, mejor conocido como “CRISPRa” (Chen y Qi, 2017; Gilbert et al. 2014).

En general, dependiendo de la naturaleza de la proteína reguladora anexa, el sistema CRISPRa es capaz de promover la expresión génica al reclutar factores de transcripción y/o al descomprimir la estructura de la cromatina en las regiones promotoras o codificantes de los genes

de interés. Tradicionalmente, el sistema CRISPRa consiste en uno o múltiples dominios activadores unidos a la dCas9; sin embargo, el uso de efectores epigenéticos como herramienta de manipulación de la transcripción a través de modificaciones de la cromatina (también conocido como edición epigenética o epigenómica) ha ido en aumento (Kungulovski y Jeltsch, 2016). En conjunto, la precisa regulación transcripcional de la información genética a través de la localización secuencia-específica de activadores transcripcionales y efectores epigenéticos, constituye una novedosa estrategia para el estudio de los sistemas biológicos (Nakamura et al. 2021; Sander y Joung, 2014). Asimismo, es una herramienta biotecnológica con aplicaciones promisorias en distintos campos disciplinarios, tales como la creación de terapias médicas innovadoras en medicina o el desarrollo de plantas mejor adaptadas a condiciones hostiles en la agricultura. En plantas de importancia agrícola, sin embargo, estudios *in vivo* sobre el sistema CRISPRa, al igual que otros sistemas regulatorios basados en nucleasas programables, se encuentran en aumento lentamente (de Melo et al. 2020; Gallego-Bartolomé et al. 2018; Papikian et al. 2019; Piatek et al. 2015; Roca Paixão et al. 2019). Aunque escasas, estas investigaciones han demostrado que tanto la regulación deliberada de la transcripción como la edición epigenética son metodologías que podrían ser incorporadas en el desarrollo de plantas con fenotipos de interés agronómico, tal como el mejoramiento de la resistencia a plagas y enfermedades agrícolas (Veley et al. 2023). En este sentido, mediante la expresión inducible o constitutiva de genes endógenos vinculados a la defensa en plantas vía CRISPRa, buscamos desarrollar cultivos agrícolas con respuestas inmunitarias energéticamente más eficientes. Particularmente, sobresalen las funciones del gen “*PATHOGENESIS-RELATED GENE 1*” (*PR-1*) (Breen et al. 2017), a través de cuya programación de su estado transcripcional y epigenético pretendemos contribuir al estudio y

potencialización de los mecanismos regulatorios asociados a la defensa en plantas que, en última instancia, permitan suprimir las infecciones causadas por fitopatógenos.

La generación de plantas editadas, a nivel transcripcional como (epi)genético, sin embargo, está sujeto a condiciones controladas y limitado a unas cuantas especies capaces de ser transformadas y regeneradas *in vitro*, lo cual dificulta la adopción de las nuevas herramientas biotecnológicas más allá de los organismos modelo. En consecuencia, la transformación genética vegetal ha sido optimizada solo en unas pocas especies de importancia agronómica. En especial, las condiciones de regeneración y transformación genética del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) han sido estudiadas extensamente (Bhatia et al. 2004; Shikata y Ezura, 2016; Van Eck et al. 2019). Además, a diferencia de otras plantas modelo, el tomate variedad Micro-Tom se caracteriza por producir frutos carnosos pequeños (Martí et al. 2006; Saito et al. 2011), lo cual facilita el estudio de rasgos agronómicos como el rendimiento y la calidad de la fruta. Adicionalmente, el tomate es un excelente modelo para el estudio de las interacciones planta-patógeno debido a su susceptibilidad a múltiples enfermedades (Arie et al. 2007). Por consiguiente, la transformación genética del tomate Micro-Tom constituye un modelo de gran utilidad para evaluar no solo la activación transcripcional de genes endógenos relacionados con la patogénesis vía CRISPRa, sino también los efectos de la regulación deliberada del gen o grupo de genes de defensa de interés en rasgos agronómicos, especialmente bajo condiciones de estrés biótico (López-Calleja et al. 2019).

Conforme a lo anterior, en el presente trabajo se describen las estrategias llevadas a cabo para integrar los componentes moleculares del sistema CRISPRa en plantas de tomate cv. Micro-Tom a través de la cepa GV2260 de *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend) Conn, con el objetivo de regular la transcripción del gen *SIPR-1* mediante las fusiones de la dCas9 con: (a) el dominio transactivador VP64, que consiste en cuatro copias en tándem del dominio de activación

mínima VP16 del virus del herpes simple (Hirai et al. 2010), y (b) el dominio catalítico SET del gen de tomate *SIATX1*, gen ortólogo de la histona H3 lisina 4 tri-metiltransferasa —H3K4me3— *ATX1* de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Alvarez-Venegas et al. 2003), los sistemas dCas9-VP64 y dCas9-ATX1-SET, respectivamente.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.

## II. Marco Teórico

### 2.1 La urgencia de un nuevo enfoque en la protección de cultivos

En contraste con las plantas silvestres, los cultivos agrícolas han padecido diversas modificaciones como resultado de las presiones de selección natural y artificial a lo largo de más de 10 mil años (Purugganan y Fuller, 2009). Estas presiones de selección dieron lugar a rasgos característicos como el síndrome de la domesticación de los cultivos (p. ej., la pérdida de los mecanismos de dispersión de semillas) que, aunque probablemente desventajosos en entornos silvestres (Miller y Morandini, 2018), facilitaron la producción de alimentos en el área agrícola. Las alteraciones genómicas y medioambientales producto de esta revolución agrícola, sin embargo, afectaron de forma indirecta otros rasgos de los cultivos, así como sus interacciones con otros organismos (Milla et al. 2015). En el caso particular de las interacciones planta-patógeno y planta-insecto, por ejemplo, la modificación del entorno silvestre en agroecosistemas altamente homogéneos, así como la reducción de la variabilidad genética de los cultivos domesticados, generaron condiciones que favorecieron la emergencia y especialización de patógenos e insectos en el área cultivable (Chen et al. 2015; Stukenbrock y McDonald, 2008).

En general, durante gran parte de la historia agrícola, los agricultores no pudieron hacer más que recurrir a los dioses o a la hechicería para intentar protegerse a sí mismos y a sus cultivos de las plagas y enfermedades (Smith et al. 1976). A medida que los primeros agricultores aprendían a lidiar con su nuevo entorno, se desarrollaron prácticas culturales y físicas que, cuando implementadas apropiada y oportunamente, permitieron reducir los daños ocasionados por estos organismos. Sin embargo, pese al esfuerzo extenuante de los agricultores, hubo insectos y patógenos cuyo potencial destructivo no pudo ser controlado por ninguna combinación de estos métodos (Smith et al. 1976). Hoy en día, las grandes epidemias en la agricultura de los últimos

siglos como las causadas por la langosta de las Montañas Rocosas (*Melanoplus spretus* Walsh) al occidente de los Estados Unidos (Lockwood, 2010), el tizón tardío de la papa [*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary] en Europa (Yoshida et al. 2013); la mancha marrón del arroz [*Cochliobolus miyabeanus* (Ito & Kuribayasi) Drechsler ex Dastur] en Bengala, India (Padmanabhan, 1973); la roya del café (*Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome) en Sri Lanka y las Américas (McCook y Vandermeer, 2015); el mal de Panamá o la fusariosis del banano [*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (E.F. Sm.) W.C. Snyder y H.N. Hansen] en Centroamérica y Sudamérica (Ploetz, 2000, 2015), así como la bacteriosis vascular de la yuca [*Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis* (Bondar)] en África central (López y Bernal, 2012), son un recordatorio de lo devastadoras que pueden llegar a ser las plagas y enfermedades agrícolas. En general, estas epidemias afectaron vastas superficies cultivadas, desolando regiones enteras. La escasez de alimentos propiciada por estos organismos, además, provocó desde inestabilidad en los mercados hasta grandes hambrunas.

En términos generales, el manejo de los agroecosistemas—incluyendo el control de plagas y enfermedades— se mantuvo de manera semejante a nivel global hasta la década de 1960, período que se caracterizó por la implementación de agroquímicos y variedades de alto rendimiento con el propósito de lidiar con la emergente inestabilidad entre el crecimiento poblacional y la capacidad productiva de los campos agrícolas (Carvalho, 2017; Khush, 2001). Aunque controversial, este acontecimiento histórico, al que se le refiere como la “Revolución Verde”, permitió duplicar la producción mundial de alimentos en tan solo 40 años: de mil millones de toneladas en 1960 a dos mil millones para el año 2000 (Khush, 2001). No obstante, lo que hizo posible este aumento exponencial en la capacidad productiva de las áreas agrícolas fue una creciente dependencia de plaguicidas y fertilizantes sintéticos con efectos adversos asociados a la exposición prolongada a

estas sustancias, tales como problemas respiratorios, reproductivos y neurológicos en humanos, así como la pérdida de biodiversidad y contaminación de los ecosistemas terrestres y acuáticos (Köhler y Triebkorn, 2013; Sánchez-Bayo y Wyckhuys, 2019; Sharma et al. 2020).

En décadas recientes, el reconocimiento de estos agentes como nocivos para la salud humana y el medioambiente ha permitido generar grandes avances en su regulación (Epstein, 2014). Pero, pese a la actual tendencia por reducir su uso en la agricultura y en otras actividades humanas, tan solo en el 2018 más de 4 millones de toneladas de plaguicidas fueron aplicados alrededor del mundo, un tercio más con respecto al año 2000 (FAO, 2020). Contradictoriamente, aunque se aplican más plaguicidas que en cualquier otro momento de la historia, el daño ocasionado por las plagas y enfermedades agrícolas ha permanecido relativamente constante a través del tiempo, con pérdidas de entre 10 y 30% de la producción global de alimentos (Savary et al. 2019). No obstante, se prevé que en las próximas décadas el cambio climático agrave el potencial destructivo de estos organismos al verse alterados factores como su distribución, proporción, voracidad y virulencia a medida que la temperatura global aumenta (Chaloner et al. 2021; Deutsch et al. 2018). En este escenario, con el objetivo de controlar infestaciones cada vez más recurrentes y destructivas, así como la emergencia de nuevos fitopatógenos e insectos plaga, los agricultores podrían verse obligados a utilizar dosis de plaguicidas cada vez más elevadas, afectando potencialmente la salud de productores, consumidores y ecosistemas adyacentes a las áreas agrícolas (Figura 1). Además de exacerbar los efectos adversos asociados a su aplicación, el uso inadecuado o desmedido de estas sustancias podría reducir la eficacia del control químico al favorecer la selección de poblaciones de insectos y patógenos resistentes, fenómeno que ha sido documentado desde inicios del siglo pasado (Melander, 1914).



**Figura 1. Aspersión de plaguicidas a los frutos de banano (*Musa paradisiaca* variedad Cavendish) en una plantación comercial en Teapa, Tabasco, México.** Los sistemas agrícolas contemporáneos son particularmente susceptibles a infestaciones de insectos y patógenos, de tal forma que la aplicación recurrente de grandes cantidades de plaguicidas resulta indispensable para prevenir la incidencia y propagación de organismos potencialmente destructivos en el agroecosistema. En la actualidad, pese a los avances en su control y prevención, los insectos y patógenos reducen de forma significativa la productividad de los cultivos y la calidad de las cosechas. Además, su control químico aumenta los costos de producción e incluso provoca la contaminación de los frutos con agentes tóxicos (p. ej., residuos de plaguicidas). Fotografía cortesía del Ing. Agr. Jesús Gilberto López Carrillo.

Este aumento exponencial de nuevas especies de artrópodos y patógenos resistentes resulta alarmante, en especial cuando el descubrimiento y desarrollo de nuevos plaguicidas, para contrarrestar la pérdida de eficacia como resultado de la evolución de la resistencia a productos

existentes, se ha vuelto cada vez más desafiante en respuesta a los cambiantes estándares regulatorios y elevados costos de producción (Sparks y Lorsbach, 2017).

En consecuencia, es imprescindible tomar medidas que permitan garantizar el acceso a una producción suficiente, nutritiva e inocua de alimentos, la cual deberá incrementar entre un 35 a 110% para satisfacer la demanda de más de 9 mil millones de personas prevista para el año 2050 (Alexandratos y Bruinsma, 2012; Tilman et al. 2011; van Dijk et al. 2021). Para enfrentar el desafío de producir más alimentos sin aumentar la presión sobre la superficie habitable de nuestro planeta, será fundamental disminuir las pérdidas causadas por las plagas y enfermedades agrícolas. Sin embargo, a diferencia de la revolución verde de 1960, el manejo de los agroecosistemas deberá realizarse de manera social y ambientalmente sostenible (Godfray et al. 2010). En este contexto, un control de plagas basado en sustancias tóxicas que dañan la salud pública y contaminan el medioambiente no solo es contrario a estos principios, sino que también inviable. Bajo esta premisa, se han desarrollado estrategias alternativas al uso de plaguicidas con el propósito de mejorar la sanidad vegetal, humana y medioambiental. Entre las más destacadas se incluyen, por ejemplo, la aplicación de agentes sintéticos, biológicos o incluso elementos benéficos inductores del sistema inmune de los cultivos agrícolas (Liu et al. 2020; Mauch-Mani et al. 2017; Weinmann et al. 2023); la generación de plantas trans-, intra- y cis-génicas (Holme et al. 2013; van Esse et al. 2020); y, recientemente, el desarrollo de nuevas tecnologías de fitomejoramiento, en especial aquellas derivadas de los sistemas CRISPR/Cas, para la edición genómica y más allá (Langner et al. 2018).

## **2.2 Edición genómica**

De manera simplificada, el genoma es el conjunto completo de información genética que es necesario para el desarrollo y sostenimiento de un ser vivo. Definiciones más elaboradas lo describen como una “entidad informativa” generalmente manifestada como ADN que, junto con otras fuentes de información, produce y mantiene a un determinado organismo (Goldman y Landweber, 2016). En organismos eucariontes, por ejemplo, el genoma puede estar constituido por miles de millones de pares de bases de ADN (alrededor de 3 mil millones en el ser humano), cuya modificación deliberada, es decir, la capacidad de introducir cambios en secuencias específicas de manera precisa, ha sido objeto de estudio de gran interés. En este contexto, la edición genómica (también conocido como edición genética o ingeniería genómica) se refiere a la capacidad de efectuar cambios en el código genético de una célula u organismo, como insertar, sustituir o eliminar secuencias o bases específicas de ADN (Adli, 2018). Durante décadas, sin embargo, la edición del genoma estaba restringida por la naturaleza estocástica de las metodologías empleadas; además, su aplicación se encontraba limitada a unas cuantas especies (Carroll, 2014). En contraste con estas metodologías, la concepción de que realizar cortes de manera programada en el ADN facilita la introducción de alteraciones genómicas en el sitio de escisión (edición genética), derivó en el desarrollo de herramientas con capacidades de edición más precisas (Carroll, 2014; Urnov, 2018).

### **2.2.1 Mecanismos de edición genómica**

En general, el principio básico de la edición genómica consiste en generar un corte de doble cadena (DSB) en el locus genómico de interés (Carroll, 2011). En el núcleo celular, esta ruptura puede ser reparada a través de uno de los dos principales mecanismos endógenos de reparación del

ADN: (1) la unión de extremos no homólogos (Hefferin y Tomkinson, 2005) y (2) la reparación dirigida por homología (Yang et al. 2020), NHEJ y HDR, respectivamente. De manera general, NHEJ es el mecanismo de reparación predominante (Lieber, 2010). Esta vía se caracteriza por su naturaleza propensa a errores, ya que frecuentemente resulta en la inserción o delección (“*indels*”) aleatoria de nucleótidos en o cerca del sitio de escisión del ADN (Carroll, 2011; Langner et al. 2018b). Gracias a esta propiedad, NHEJ es empleado de forma habitual para inactivar genes (“*gene knockout*”) —considerado como la forma más simple de edición genómica— al crear *indels* en las regiones promotoras o codificantes de los genes de interés (Chen et al. 2019). No obstante, este mecanismo carece de la precisión necesaria para introducir modificaciones genéticas más sofisticadas. La reparación dirigida por homología (HDR), en cambio, puede ser empleada para introducir mutaciones puntuales, así como insertar o reemplazar secuencias específicas de ADN (Chen et al. 2019). Sin embargo, la reparación del DSB mediado por HDR ocurre con menor frecuencia. Además, este mecanismo de reparación del ADN requiere de una secuencia molde, de cadena doble o sencilla y con extremos homólogos al sitio de ruptura, que contenga la modificación genética que desea ser incorporada (Salsman y Deltre, 2016). Por otra parte, la escisión del ADN puede generarse de forma secuencia-específica a través de nucleasas programables, lo cual permite estimular la recombinación del ADN e introducir las alteraciones genómicas de interés de manera localizada (Wang et al. 2016) —de allí el término edición genómica—.

### **2.2.2 Herramientas de edición genómica**

Con el objetivo de introducir DSBs en el genoma de células de origen vegetal y animal, a inicios de 1990 se utilizaron las primeras nucleasas de secuencia específica (Puchta et al. 1993; Rouet et al. 1994). Aunque en principio inadvertido, estos estudios establecieron los principios

básicos de la ingeniería genómica moderna que, en conjunto con otros descubrimientos de la época, condujeron al desarrollo de las primeras herramientas de edición genómica a partir de nucleasas programables (Robb, 2019). Actualmente, tres principales nucleasas programables han sido introducidas como novedosas herramientas de edición genómica, cuyas capacidades de edición poseen un control, precisión y aplicabilidad sin precedentes: las (a) nucleasas de dedos de zinc (ZFNs, del inglés “*Zinc-finger nucleases*”) (Bibikova et al. 2003); (b) las nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALENs, de inglés “*transcription activator-like effector nucleases*”) (Christian et al. 2010); y (c) varios tipos de nucleasas guiadas por moléculas de ARN derivadas de los sistemas CRISPR/Cas (Jinek et al. 2012). De manera general, el mecanismo bajo el que operan estos sistemas es conceptualmente el mismo: generar un DSB en el sitio genómico de interés a partir de una enzima endonucleasa. Con esta finalidad, los sistemas ZFNs y TALENs emplean a FokI, una enzima de restricción tipo IIS, mientras que en los sistemas CRISPR/Cas se utiliza la proteína Cas9, principalmente (Mojica y Montoliu, 2016). Gracias a la capacidad programable de las proteínas modulares de unión al ADN de los sistemas ZFNs y TALENs, así como del ARN guía de cadena sencilla (sgRNA) de los sistemas CRISPR/Cas, la secuencia genómica de interés puede ser localizada (Mojica y Montoliu, 2016). Posteriormente, la escisión del ADN, ya sea a través de FokI, Cas9 o sus variantes, estimula los mecanismos endógenos de reparación del ADN (Kim y Kim, 2014), los cuales pueden conducir a la introducción de *indels* o el reemplazo de la secuencia original dependiendo de la edición deseada.

Pese a las numerosas demostraciones exitosas de edición genómica en varios organismos, el diseño y la construcción poco asequible, además de altamente laborioso, de los sistemas ZFNs y TALENs, han ocasionado que estas herramientas sean rápidamente sustituidas por la simplicidad y facilidad de uso del sistema CRISPR/Cas9 (Mojica y Montoliu, 2016). En general, los sistemas

ZFNs y TALENs emplean dominios catalíticos con actividad endonucleasa fusionados a proteínas modulares de unión al ADN para introducir DSBs en loci genómicos específicos (Sander y Joung, 2014). El sistema CRISPR/Cas9, en cambio, está constituido únicamente por el complejo Cas9-sgRNA: una proteína ADN-endonucleasa unida a un ARN “guía” o sgRNA personalizable, el cual híbrida de manera específica e induce una ruptura de doble cadena en secuencias complementarias de ADN (Jinek et al. 2012). En este sentido, la Cas9 puede ser fácilmente programada para introducir un DSB en un objetivo genómico en específico tan solo con personalizar un sgRNA homólogo al sitio de interés. Así mismo, múltiples sgRNAs pueden ser utilizados simultáneamente para localizar diferentes regiones genómicas en una misma célula (Cong et al. 2013), lo cual facilita la edición de varios genes a la vez y la creación de deleciones genómicas más precisas. Todo lo anterior no solo ha llevado a considerar al sistema CRISPR/Cas9 como una de las herramientas de edición genómica contemporáneas más asequibles y fácil de diseñar (Mojica y Montoliu, 2016), sino también altamente eficiente y específica para llevar a cabo las modificaciones genéticas de interés en el genoma de virtualmente cualquier organismo.

### **2.3 CRISPR/Cas: del sistema inmunitario adaptativo en procariontes a la edición de genomas**

Gran parte de los organismos procariontes poseen sofisticados sistemas inmunitarios adaptativos y hereditarios denominados CRISPR/Cas, un mecanismo de defensa basado en pequeños fragmentos de ARN para la detección y el silenciamiento específico de ácidos nucleicos de origen viral o plasmídico (Jiang y Doudna, 2017). De manera general, estos sistemas están conformados por dos componentes principales: (a) una región compuesta por secuencias repetidas (repeticiones directas) e interespaciadas por otras secuencias variables de ADN (espaciadores) conocida como “CRISPR array” y (b) un conjunto agrupado de genes asociados a CRISPR que

codifican proteínas con actividad nucleasa (Hsu et al. 2014; Jiang y Doudna, 2017). Tanto en bacterias como en arqueas, estos sistemas inmunitarios previenen la reinfección de fagos u otros elementos genéticos móviles (MGEs) a través de una serie de procesos que derivan en la inmunidad adquirida mediada por CRISPR/Cas, la cual, de manera simplificada, puede resumirse en tres fases: adaptativa, expresión e interferencia (Newsom et al. 2021; Rath et al. 2015). Durante la fase adaptativa, una bacteria o arquea que ha sido infectada integra pequeños fragmentos de ADN [correspondientes al elemento genético invasor (protoespaciadores)] en forma de un nuevo espaciador dentro del CRISPR array en el cromosoma del hospedero (Hsu et al. 2014; Newsom et al. 2021). Posteriormente, durante las fases de expresión e interferencia, el nuevo espaciador y los demás elementos dentro del CRISPR array son transcritos en un único ARN largo precursor de CRISPR (pre-crRNA), cuyo procesamiento enzimático produce ARN guías cortos (crRNAs) (Hille y Charpentier, 2016; Wright et al. 2016). Estos crRNAs procesados pueden unirse de forma específica a secuencias complementarias de protoespaciadores virales o plasmídicos, así como formar complejos con las proteínas Cas (Jiang y Doudna, 2017). De esta forma, si la reinfección ocurre, los crRNAs se unen a las proteínas Cas y, a través de la actividad nucleasa de estas últimas, dirigen el silenciamiento específico de los elementos genéticos invasores cuyas secuencias blanco sean complementarias a las secuencias guías del crRNAs (Jiang y Doudna, 2017; Wright et al. 2016).

### **2.3.1 Clasificación de los sistemas CRISPR/Cas**

Actualmente, los sistemas CRISPR/Cas pueden clasificarse en dos grandes clases, los cuales se subdividen en seis tipos (I–VI) y varios subtipos, cada uno de los cuales posee un conjunto de proteínas Cas característico (Hille et al. 2018). Por ejemplo, los sistemas de la Clase

1 (los tipos I, III y IV) se caracterizan por emplear múltiples complejos de proteínas Cas para el reconocimiento y la escisión de material genético invasor, mientras que los sistemas de la Clase 2 (los tipos II, V y VI) emplean una proteína efectora Cas única (Hille et al. 2018). Particularmente, el tipo II es el sistema CRISPR/Cas mejor caracterizado (Chylinski et al. 2014; Hille et al. 2018); además, ostenta ser el sistema que, al dilucidarse los principales mecanismos que dirigen la escisión programada de ADN viral o plasmídico durante la fase de interferencia, estableció las bases de la ingeniería genómica a partir de nucleasas de ADN provenientes de los sistemas CRISPR/Cas (Gasiunas et al. 2012).

### **2.3.2 El sistema CRISPR/Cas tipo II**

Para escindir ADN de origen viral o plasmídico durante la respuesta inmunitaria adaptativa, las bacterias con sistemas CRISPR/Cas tipo II emplean los siguientes tres componentes: (a) una proteína Cas única, la Cas9, la endonucleasa más común y mejor estudiada; (b) la síntesis de crRNAs a partir del CRISPR array; y (c) un crRNA transactivador (tracrRNA), un ARN no codificante necesario para el procesamiento del pre-crRNA y la unión de la Cas9 a secuencias específicas de ADN (Deltcheva et al. 2011; Hsu et al. 2014; Jiang y Doudna, 2017).

De manera similar a los procesos anteriormente descritos que derivan en la inmunidad adquirida mediada por CRISPR/Cas, un “registro genético” de infecciones previas, el cual permitirá al hospedero prevenir la reinfección de los mismos elementos genéticos infecciosos en el futuro, es establecido en forma de nuevos espaciadores dentro del CRISPR array en el cromosoma de bacterias con el sistema CRISPR/Cas tipo II (Jiang y Doudna, 2017). De igual forma, la posterior transcripción del CRISPR array resulta en la síntesis del pre-crRNA, el cual contiene tanto repeticiones directas como espaciadores. Inherente al sistema tipo II, el tracrRNA

es transcrito de manera individual y, mediante el emparejamiento de bases con las repeticiones directas, se une al pre-crRNA para continuar con el procesamiento de crRNAs guías cortos (Jiang y Doudna, 2017). Cada unidad de crRNA-tracrRNA procesado resulta en una estructura de ARN dual de 20 nucleótidos de extensión (Jiang y Doudna, 2017), la cual dirige a la Cas9 a secuencias de ADN de doble cadena de origen viral o plasmídico que contengan bases complementarias (Gasiunas et al. 2012; Jinek et al. 2012). Cabe resaltar que, tanto para la apropiada unión de la Cas9 como para la inducción de su actividad endonucleasa, la presencia de un motivo adyacente de protoespaciador (PAM) es indispensable. De manera general, los PAM son secuencias conservadas de ADN (de 2 a 6 pares de bases) que forman parte del genoma de los virus y de otros MGEs, pero no de las bacterias (Shah et al. 2013). En el sistema CRISPR/Cas de *Streptococcus pyogenes*, por ejemplo, la Cas9 se une al PAM trinucleótido 5'-NGG-3' para posteriormente “interrogar” a la secuencia de ADN adyacente a través del ARN guía en busca de complementariedad (Sternberg et al. 2014). Si las bases del ARN guía y la hebra de ADN interrogada son complementarias, la Cas9 cataliza un DSB tres bases río arriba de la secuencia PAM a través de dos dominios conservados con actividad nucleasa: los dominios HNH y RuvC, los cuales escinden tanto la hebra de ADN blanco (cuyas bases son complementarias a la secuencia guía del sgRNA) como la hebra opuesta a esta, respectivamente (Jiang y Doudna, 2017).

### **2.3.3 El sistema CRISPR/Cas9 como herramienta de edición genómica**

En el año 2012, la capacidad bioquímica de escindir ADN de doble cadena *in vitro* a partir de la reconstrucción parcial del sistema CRISPR/Cas tipo II de la bacteria *S. pyogenes* estableció las bases para la concepción y validación de una nueva herramienta de edición genómica: el sistema CRISPR/Cas9 (Jinek et al. 2012). Este sistema está basado en el complejo Cas9-crRNA-

tracrRNA, cuya propiedad guía de sus dos últimos componentes ha sido conservada en un único ARN dual, mejor conocido como sgRNA o ARN guía: una molécula quimérica de ARN que consiste en un fragmento del tracrRNA unido a un crRNA personalizado para cada objetivo en particular. En el extremo 5' del sgRNA una secuencia guía de 20 nucleótidos determina el sitio de unión al ADN a través de la complementariedad de bases de Watson-Crick y, en el extremo opuesto, una estructura de doble cadena se une a la Cas9 (Doudna y Charpentier, 2014). Estas modificaciones, en general, originaron un sistema simple de dos componentes en el que la secuencia guía del complejo Cas9-sgRNA híbrida de forma específica e induce una ruptura de doble cadena en secuencias complementarias de ADN ubicadas de forma adyacente al PAM trinucleótido 5'-NGG-3' (Doudna y Charpentier, 2014; Jiang y Doudna, 2017).

#### **2.4 Más allá del “corta y pega”: el sistema CRISPR/dCas9**

Tras la demostración inicial de su uso potencial como herramienta de edición genómica, un amplio número de estudios ha validado la capacidad programable del complejo Cas9-sgRNA para introducir cortes de cadena doble o DSBs *in vivo* e *in vitro* (Feng et al. 2013; Gratz et al. 2013; Hwang et al. 2013). A la fecha, el sistema CRISPR/Cas9 de *S. pyogenes* ha permitido introducir modificaciones genéticas puntuales en el genoma de una amplia gama de organismos, entre los que se incluyen no solo organismos modelo como el pez cebra (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan), la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster* Meigen) y la planta *A. thaliana*, sino también plantas silvestres (Ferne y Yan, 2019), cultivos agrícolas (Gao, 2021), animales exóticos (Reardon, 2019) e incluso embriones humanos (Pei et al. 2017), de tal forma que el catálogo de organismos modelo genéticamente manipulables ha sido ampliado drásticamente. En la actualidad,

sin embargo, la versatilidad con la que el sistema CRISPR/Cas9 puede ser modificado ha dado lugar a herramientas con aplicaciones más allá de la edición genómica.

Por ejemplo, la abolición de su actividad endonucleasa, resultado de introducir mutaciones puntuales (H840A y D10A) en los dominios catalíticos HNH y RuvC de la Cas9, convierte a la Cas9 en un dominio genérico de unión al ADN incapaz de inducir un DSB (Jinek et al. 2012). La proteína Cas9 catalíticamente inactiva resultante (dCas9) todavía conserva la capacidad de unirse a secuencias específicas de ADN. Sin embargo, en lugar de alterar de manera irreversible la información genómica, esta proporciona un mecanismo simple, dinámico y multifuncional para el reclutamiento secuencia-específico de proteínas con funciones tales como la regulación programada de la transcripción, la modificación dirigida de marcas epigenéticas y la visualización del genoma, “*genome imaging*” (Chen et al. 2019). En particular, la localización de dominios autónomos de activación o represión transcripcional constituyen un poderoso conjunto de herramientas para la regulación deliberada y reversible de la expresión génica, tanto para activar genes de interés como para reprimir su transcripción, respectivamente (Gilbert et al. 2013; Gilbert et al. 2014). En general, el mecanismo bajo el que operan estos sistemas se basa en la capacidad del complejo dCas9-sgRNA de actuar como un andamio por medio del cual se pueden reclutar, de manera predecible y fácilmente programable, diversas proteínas efectoras (proteínas o dominios proteicos) entre los que se incluyen activadores y represores transcripcionales, usualmente fusionados a la dCas9 (Moradpour y Abdulah, 2020; Karlson et al. 2021; Pan et al. 2021). Por lo general, la proteína reguladora anexa es dirigida a la región promotora o codificante de un gen con fin de modular la expresión de este último. De esta forma, si, por ejemplo, se plantea “activarlo”, se fusionan activadores transcripcionales a la dCas9. Caso contrario, si lo que se pretende es “reprimirlo”, se emplean represores de la transcripción (Karlson et al. 2021).

La expresión génica, sin embargo, no solo depende de la presencia o ausencia de reguladores transcripcionales, generalmente factores de transcripción basales, sino también de la accesibilidad de la cromatina (Gardiner et al. 2022). En este sentido, la modificación dirigida de marcas epigenéticas asociadas a un estado transcripcionalmente activo o inactivo de la cromatina ha emergido como un método alternativo para modular la expresión de genes endógenos. En general, la localización secuencia-específica de efectores epigenéticos permite introducir alteraciones fisicoquímicas en el ADN y las histonas a partir de las cuales pueden establecerse relaciones causales entre la presencia de la proteína efectora anexa, los cambios epigenéticos inducidos y su efecto en la expresión o el silenciamiento génico (Nakamura et al. 2021). En efecto, con el fin de introducir alteraciones epigenéticas puntuales algunos efectores epigenéticos han sido fusionados a las proteínas modulares de unión al ADN de los sistemas ZFN y TALENs (Thakore et al. 2016). Sin embargo, los mismos factores que limitan la aplicación de estos sistemas en la edición genómica también dificultan su uso potencial como herramientas de edición epigenética. El sistema CRISPR/dCas9, en cambio, utiliza pequeños fragmentos personalizables de ARN para localizar el efector epigenético de interés en la región genómica deseada. Esta maleabilidad y facilidad de uso en sus versiones catalíticamente activa como inactiva, por consiguiente, no solo ha permitido desarrollar herramientas con la capacidad de editar la información genómica, sino también regularla, a nivel transcripcional como epigenético, de forma precisa.

#### **2.4.1 El sistema CRISPRa**

La fusión de proteínas efectoras de funciones reguladoras distintas en cualquiera de los extremos C- o N-terminal de la proteína dCas9 ha generado un conjunto de herramientas moleculares capaces de regular la transcripción de forma precisa. En el caso particular del sistema

de activación transcripcional inducida por CRISPR/dCas9 (CRISPRa), la proteína reguladora anexa consiste generalmente en un dominio activador, el cual, una vez localizado, promueve la transcripción del gen o el grupo de genes objetivo (Gilbert et al. 2014; Gilbert et al. 2013). Tradicionalmente, cuatro copias en tándem del dominio transactivador VP16 del virus del herpes simple o una copia única del dominio activador p65 unidos al complejo dCas9-sgRNA (los complejos dCas9-VP64 y dCas9-p65, respectivamente) constituyen la primera generación de sistemas CRISPRa (Lowder et al. 2017; Pan et al. 2021). En especial, gracias a su capacidad para inducir niveles modestos de sobreexpresión, así como por su diseño simple, el complejo dCas9-VP64 ha sido usado ampliamente como un potente activador transcripcional sintético (Liu y Stewart, 2016). Este complejo ha demostrado ser eficaz para inducir la expresión de genes endógenos en un gran número de organismos, incluyendo plantas (Lowder et al. 2015). Además, al co-expresar múltiples copias de sgRNAs, su capacidad de activación se ha visto potenciada (Maeder et al. 2013; Perez-Pinera et al. 2013). Sin embargo, debido a que los dominios de activación transcripcional que conforman al tetrámero VP64 activan la expresión génica al reclutar múltiples componentes del complejo de pre-iniciación (Hilton et al. 2015), su eficiencia de activación es dependiente del estado epigenético del gen de interés (Lau y Suh, 2018). En consecuencia, la aplicación del complejo dCas9-VP64 podría estar limitada a aquellas regiones genómicas en las que la configuración de la cromatina no impida su acceso al ADN. En efecto, cuando este complejo regulatorio ha sido ineficaz en activar la expresión génica o la expresión conseguida es relativamente baja, la secuencia genómica de interés ha sido transcrita al localizar marcas epigenéticas que, directa o indirectamente, influyen en la descompactación de la cromatina (Hilton et al. 2015). En la actualidad, por consiguiente, dada la relevancia del estado epigenético de un gen con respecto a su transcripción, en algunos de los sistemas regulatorios modernos se han

incluido, además de activadores transcripcionales, moduladores epigenéticos capaces de reprogramar el epigenoma.

En contraste con los sistemas CRISPRa tradicionales, estos sistemas modulan la expresión génica al introducir alteraciones epigenéticas ampliamente asociadas con un estado de la cromatina transcripcionalmente activa (Hilton et al. 2015; Sajwan y Mannervik, 2019). En especial, las modificaciones post-traduccionales de las histonas (PTHTMs) constituyen un mecanismo evolutivo conservado ampliamente asociado a diversos procesos biológicos de la célula eucariota, tales como la compactación de la cromatina, la dinámica nucleosomal y la transcripción (Bain, 2019). De las distintas modificaciones post-traduccionales que sufren residuos específicos de las histonas, aquellas que se producen en la región de la “cola” amino-terminal son las mejor estudiadas. Estas incluyen, por ejemplo, la acetilación de lisinas; la fosforilación de serinas, treoninas y tirosinas; la metilación de lisinas y argininas, entre otros, cuya adición o delección puede alterar la compactación de la cromatina y, por consiguiente, modular la accesibilidad de factores de transcripción y otras proteínas al ADN (Bain, 2019; Gardiner et al. 2022). Particularmente, marcas como la acetilación de histonas, en lo general, y otras más específicas como la trimetilación de las lisinas K4 y K36 de la histona H3 (H3K4me3 y H3K36me3, respectivamente) son modificaciones epigenéticas ampliamente asociadas a un estado de la cromatina transcripcionalmente activa (Lee et al. 2010; Liu et al. 2010). En general, aquellas regiones genómicas en las que las colas de las histonas asociadas con el ADN se encuentran “etiquetadas” por alguna de estas modificaciones, la cromatina se presenta en un estado “laxo”, dejando expuesto al ADN para su transcripción. Consecuentemente, esto ha llevado a considerar al establecimiento sintético de grupos metilo y acetilo en los residuos lisina de las colas N-terminales de las histonas, a través de la fusión de la dCas9 con efectores epigenéticos como las enzimas metiltransferasas y acetiltransferasas de

histonas (HMTs y HATs, respectivamente), como un método de regulación epigenética de la transcripción vía CRISPRa (López-Calleja et al. 2019).

## **2.5 Aplicaciones del sistema CRISPRa en el desarrollo de cultivos agrícolas resistentes al estrés biótico**

En contraste con el control químico, el desarrollo de variedades resistentes al estrés biótico es una de las estrategias de protección de cultivos ambientalmente más sostenibles. Históricamente, técnicas tradicionales de mejoramiento genético vegetal como la selección artificial, la hibridación, y más recientemente, la mutagénesis inducida, entre otros, han contribuido a la mejora genética de la resistencia a plagas y enfermedades agrícolas (Langner et al. 2018). Desde hace tres décadas, además, el fitomejoramiento convencional ha sido complementado con la tecnología del ADN recombinante (Langner et al. 2018; Ran et al. 2017), un proceso a través del cual secuencias exógenas de ADN son introducidas en el genoma vegetal para conferir a las plantas rasgos de interés agronómico generalmente intransferibles por medio de métodos convencionales. La mejora tradicional de la resistencia en plantas, sin embargo, requiere de mucho tiempo y esfuerzo, además de ser inespecífica, de modo que los programas de mejoramiento genético vegetal basados en métodos convencionales no pueden seguir el ritmo de las crecientes demandas alimentarias ni de la constante adaptación de poblaciones de insectos y patógenos (Chen et al. 2019; Rato et al. 2021). Asimismo, pese a que la introducción de genes a través de herramientas biotecnológicas ha derivado en el desarrollo de variedades resistentes, así como en cultivos con propiedades nutricionales mejoradas, entre otras características que han permitido tanto incrementar la producción global de alimentos como disminuir el uso de plaguicidas y mejorar la nutrición (Zaidi et al. 2019), muchos factores continúan limitando el

cultivo y la comercialización de las plantas genéticamente modificadas en la actualidad (Langner et al. 2018), indistintamente de la procedencia del material genético insertado (p. ej., trans-, intra- y cis-génesis).

En años recientes, avances tanto en la edición como en la regulación deliberada de la información genómica han permitido trascender gran parte de las limitaciones asociadas a estas metodologías (Chen et al. 2019; Moradpour y Abdulah, 2020). A diferencia de la edición genómica, la regulación programada de la expresión génica a través del sistema CRISPRa plantea la posibilidad de generar plantas de importancia agrícola resistentes a plagas y enfermedades sin introducir alteraciones genómicas irreversibles (Selma y Orzáez, 2021), tal como aquellas derivadas del fitomejoramiento tradicional, la transgénesis o la edición de genes S y R a través de nucleasas programables. En especial, a medida que se revela progresivamente el papel de la metilación del ADN y las PTHMs en el control de la expresión génica (Selma y Orzáez, 2021), la modificación dirigida de marcas epigenéticas podría implementarse como una estrategia de mejoramiento (epi)genético de la defensa en plantas (“epi-breeding”), reversible y ajustable a estímulos medioambientales. Bajo esta premisa, por consiguiente, teorizamos que el posicionamiento sintético de marcas como la H3K4me3 y H3K36me3 (importantes en la memoria celular y el establecimiento de un estado transcripcional “permissivo”) en las regiones promotoras o codificantes de genes endógenos vinculados a la defensa en plantas, conduzca al desarrollo de respuestas inmunitarias (contexto-dependientes) más rápidas, robustas y energéticamente eficientes. Además de reducir los daños ocasionados por las plagas y enfermedades agrícolas, la edición epigenética de genes de defensa podría mejorar nuestra comprensión acerca de los mecanismos epigenéticos implicados en el establecimiento y regulación de los medios adaptativos de defensa en plantas (Agarwal et al. 2020; López-Calleja et al. 2019, 2021), en particular aquellos

asociados al *priming*: “una forma de plasticidad fenotípica, la cual permite que plantas con el mismo genoma expresen diferentes fenotipos de resistencia” (Wilkinson et al. 2019).

### **2.5.1 Develando los mecanismos epigenéticos del *priming* en la defensa vegetal**

En general, el estado primado de la defensa en plantas (“defense priming”) es un fenómeno que se caracteriza por la activación rápida y/o robusta de los mecanismos de defensa ante un nuevo desafío (p. ej., la reinfección de un fitopatógeno). Este aumento en la capacidad defensiva de las plantas luego de un estrés transitorio, no letal, se asocia, entre otros factores, a cambios epigenéticos en el ADN y las histonas (Harris et al. 2023). Sin embargo, a pesar de que el tratamiento con estímulos físicos, químicos o biológicos son métodos efectivos para inducir el *priming* (Conrath et al. 2015; Mauch-Mani et al. 2017), estos no nos permiten dilucidar la función de las alteraciones epigenéticas generadas en la regulación de la expresión génica y la memoria celular, ni determinar si el fenómeno observado (p. ej., resistencia a patógenos) puede ser considerado epigenético o tener otra naturaleza causal. En la actualidad, por consiguiente, aunque se han documentado extensamente cambios en los patrones de metilación del ADN y las histonas en plantas cuyas defensas han sido sensibilizadas a través del *priming*, su contribución a la resistencia inducida a enfermedades sigue siendo en gran medida “correlativa” y “circunstancial” (Harris et al. 2023). Solo recientemente, con el desarrollo de herramientas de edición epigenómica que permiten añadir o eliminar con precisión marcas epigenéticas individuales, podemos comenzar a desentrañar las relaciones causales entre las modificaciones epigenéticas inducidas y su efecto en la respuesta y regulación de los genes de defensa ante interacciones bióticas, tanto benéficas como perjudiciales.

## **2.5.2 Hacia el mejoramiento epigenético de la defensa en plantas contra patógenos vía CRISPRa**

En el marco de este trabajo, la edición epigenómica a través del sistema CRISPRa consiste en la activación de genes específicos a partir de la modificación de su estado epigenético en sitios genómicos predefinidos (generalmente las regiones promotoras o reguladoras de un gen). Este control sobre la transcripción de uno o un grupo de genes se caracteriza por ser reversible y, en algunos casos, condicionado a estímulos externos a la célula u organismo cuyo epigenoma ha sido editado (Kakoulidou et al. 2021). En plantas, esta capacidad de gestionar una respuesta transcripcional de forma más eficiente según el contexto medioambiental y biológico es particularmente relevante bajo condiciones dinámicas como las presentes en los sistemas agrícolas, donde una amplia gama de interacciones (a)bióticas inciden simultáneamente sobre los cultivos. Básicamente, en este modelo de fitomejoramiento la síntesis de epi-efectores podría conducir al establecimiento de marcas epigenéticas clave en la regulación de respuestas genéticas favorables frente a eventos biológicos o ambientales adversos presentes en algún momento del desarrollo de un cultivo (p. ej., epidemias o sequías), llegando a transferir las alteraciones epigenéticas inducidas (epi-alelos) incluso en ausencia del sistema CRISPRa en las siguientes generaciones (Gardiner et al. 2022). En el contexto de la respuesta inmunitaria de las plantas, por consiguiente, es tentador especular que la edición dirigida del epigenoma para la activación inducible o constitutiva de genes que son importantes para la defensa contra patógenos mejore la capacidad de los cultivos para resistir a las enfermedades en una o en múltiples generaciones a través de mecanismos de regulación y adaptación epigenética al estrés biótico ya conocidos (consultar a Kang et al. 2022; Wilkinson et al. 2019). Sin embargo, si bien la edición epigenómica puede llegar a proporcionar una forma precisa y efectiva de controlar la expresión de genes asociados a rasgos agronómicos

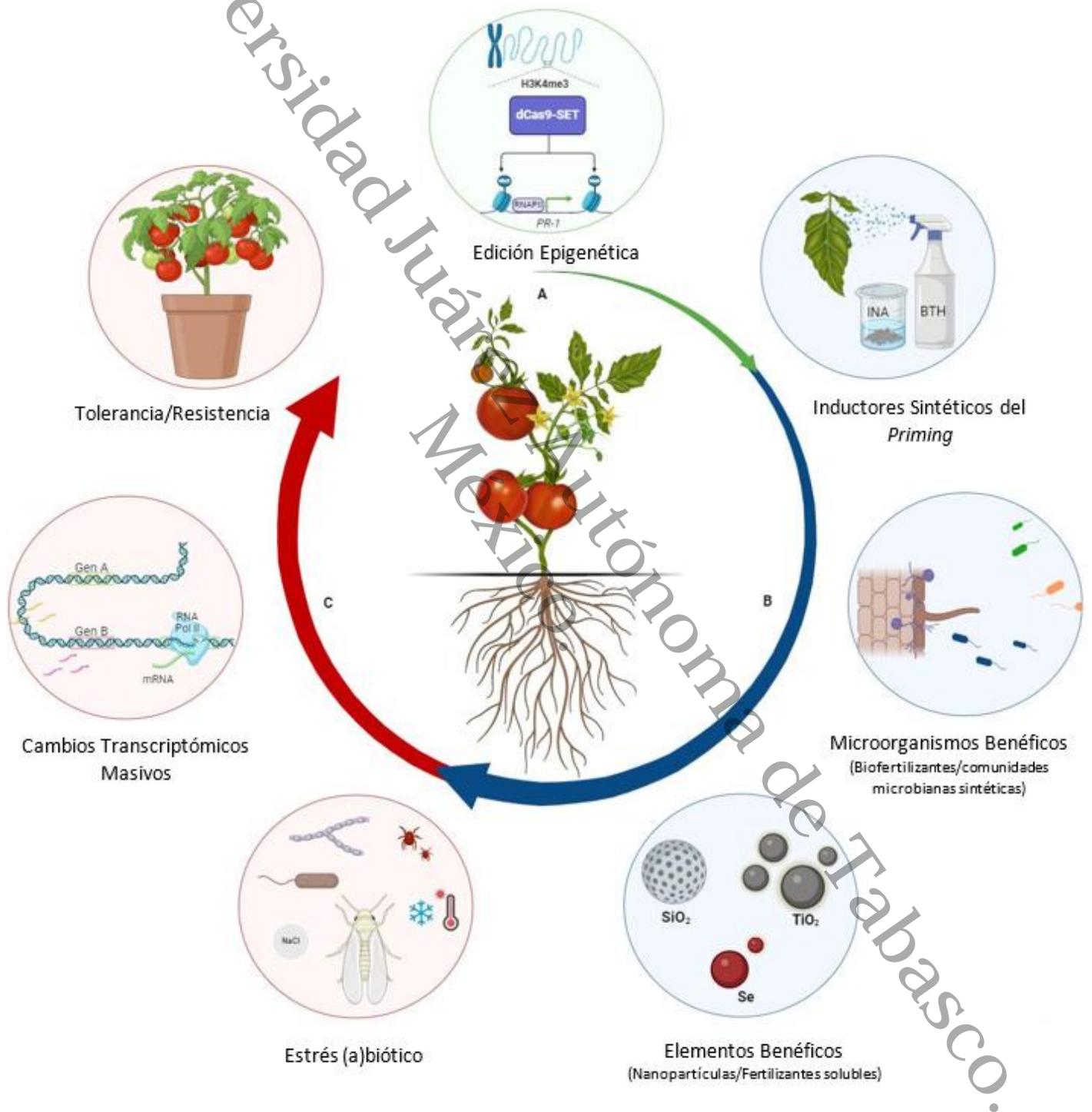
de interés, el mejoramiento epigenético de la resistencia a enfermedades requiere de un conocimiento más profundo acerca de la regulación epigenética de los genes de defensa en respuesta a condiciones multifactoriales, además de un mayor refinamiento de los métodos de transformación genética de plantas (Kakoulidou et al. 2021). En consecuencia, es de esperar que avances en las herramientas de edición epigenómica en combinación con una mejor comprensión de los mecanismos epigenéticos que rigen el establecimiento de respuestas de adaptación al estrés a nivel generacional y transgeneracionales, pongan a disposición de los fitomejoradores un gran número de alteraciones epigenéticas, colectivas e individuales, en los diferentes niveles de organización de la cromatina para el desarrollo de cultivos agrícolas capaces de desplegar respuestas transcripcionales de forma rápida y reversible al estrés (un rasgo que adquiere mayor relevancia frente a condiciones climáticas cada vez más inestables).

### **2.5.3 En búsqueda de la inmunidad: efecto sinérgico de la edición epigenética y el *priming* en la defensa vegetal**

El mejoramiento epigenético de la resistencia en plantas vía CRISPRa es una novedosa estrategia de fitomejoramiento para la protección sostenible de cultivos. Esta técnica busca inhibir las infecciones causadas por patógenos al aumentar la expresión de genes de defensa endógenos clave en la regulación de la resistencia al estrés biótico (López-Calleja et al. 2019). Además de ser reversible, este aumento en la expresión del gen de defensa deseado puede ser inducido activamente o como resultado de un estímulo, dando lugar a plantas con niveles de expresión basal elevados o con una mayor eficiencia de activación ante una situación de estrés biótico, respectivamente. Esta capacidad de (re)programar el estado transcripcional y epigenético de genes asociados a la defensa, además, abre la posibilidad de diseñar nuevas estrategias en combinación

con el *priming* encaminadas a optimizar el control de plagas y enfermedades agrícolas (López-Calleja et al. 2019). Al respecto, además de sus propiedades intrínsecas, algunos tratamientos con compuestos naturales o sintéticos, así como con microorganismos y elementos benéficos, poseen la capacidad de primar las defensas de las plantas contra un amplio espectro de amenazas. Estos inductores de la resistencia han sido evaluados tanto de manera individual como en sinergia con agroquímicos u otros activadores del *priming* con el fin de brindar a las plantas la mejor protección posible (Conrath et al. 2015; El-Shetehy et al. 2021; Zehra et al. 2017). Por consiguiente, es razonable evaluar enfoques inmunológicos que permitan canalizar respuestas transcripcionales globales y específicas por medio de la acción sinérgica del *priming* con la edición epigenética, y viceversa. En términos generales, este enfoque integrado busca aprovechar “la capacidad de la edición epigenética para modular la expresión de un gen (gen central/marcador/maestro) —que puede o no tener efecto en la expresión de otros genes o vías de señalización asociadas a la defensa—, mientras que el *priming* —reflejado en un gran número de genes y manifestado en términos de su expresión y modificaciones a la cromatina— refuerza esta respuesta”, por ejemplo, al sensibilizar las defensas inducibles del sistema inmunitario vegetal (Alvarez-Venegas, R, comunicación personal, 2023; Nicolas Ventura, 2024). De igual forma, en un enfoque epigenético inverso, la edición epigenómica vía CRISPRa puede usarse para “acondicionar” a los genes de defensa involucrados en la memoria al estrés biótico con el objetivo de mejorar la capacidad de respuesta de los cultivos a los tratamientos con inductores del *priming* (Gohari et al. 2024). Como destacó el Dr. R. Álvarez-Venegas, “en ambos casos la idea es potenciar la edición epigenética (de un gen central/marcador/maestro) con ayuda del *priming* [o potenciar el *priming* con ayuda de la edición epigenética], para conferir resistencia a las plantas contra un amplio espectro de amenazas”

(comunicación personal, 2023; Nicolas Ventura, 2024), e incluso aumentar su tolerancia al estrés abiótico —p. ej., como resultado de las propiedades inherentes de algunos elicitores— (Figura 2).



**Figura 2. Aplicaciones del sistema CRISPRa en la protección sostenible de cultivos: estrategias basadas en la inducción química, biológica y mineral del *priming*.** El efecto combinado de la edición epigenética y el *priming* a través de inductores de tipo biológico, mineral o sintético con propiedades fisiológicas, estructurales, antibióticas o germicidas inherentes, benéficas para los cultivos, abre la posibilidad de diseñar nuevas estrategias de protección de cultivos más integrales que contribuyan a la supervivencia de las plantas en ambientes hostiles. A) Edición epigenética de genes de defensa vía CRISPRa; B) inductores del *priming* con propiedades benéficas inherentes; C) defensas estructurales e inducibles potenciadas por la acción sinérgica del *priming* con la edición epigenética. Figura elaborada en BioRender.com con ilustraciones amablemente diseñadas por la ilustradora Isaura Centurión de la Cruz (planta de tomate).

#### 2.5.4 Regulación de las comunidades microbianas

En un proceso dinámico, las interacciones con microorganismos pueden desencadenar cambios epigenéticos con la capacidad de inducir alteraciones fenotípicas, las cuales, a su vez, modulan las interacciones bióticas (Alonso et al. 2019). Dada la capacidad de la edición epigenómica para alterar selectivamente los patrones epigenéticos, se deduce que, mediante la reconfiguración del estado epigenético de las regiones promotoras de algunos genes de defensa ampliamente asociados a la regulación de las interacciones bióticas del suelo, se podría promover la expresión de fenotipos resistentes a patógenos sin incurrir en un aumento de las defensas como resultado de la percepción de un estímulo que no constituye un peligro. En particular, sin afectar las relaciones simbióticas con microorganismos beneficiosos (costos ecológicos), los cuales desempeñan un papel crucial en la mediación de la resistencia inducida al estrés biótico (Pieterse et al. 2014). En este sentido, tanto la regulación transcripcional como la edición epigenómica de genes marcadores de la defensa en plantas son dos estrategias que podrían ser utilizadas para alterar la composición de las comunidades microbianas asociadas a las raíces de plantas editadas, estableciendo así un tipo de regulación de las interacciones entre plantas y microorganismos del suelo, basado en CRISPRa, que propicie la presencia natural o inducida de bacterias y hongos benéficos sobre las enfermedades del suelo (lo cual es el objetivo central del proyecto

FORDECYT-PRONACES/6360/2020 titulado “Targeted epigenome editing in tomato via CRISPR/dCas for activation of plant defense genes against pathogens, and the assessment of the microbiome by next-generation sequencing coupled with metagenomic analysis to study the microbial community structures in edited plants”, cuyo responsable técnico del mismo es el Dr. Raúl Álvarez Venegas).

## 2.6 Genes asociados a la inmunidad y reguladores epigenéticos

Recientemente, se ha sugerido el uso de la edición epigenética mediante CRISPRa para mejorar la resistencia de los cultivos agrícolas al estrés biótico (López-Calleja et al. 2019). Esta estrategia se basa en la sobreexpresión, ya sea se forma inducible o constitutiva, de genes endógenos clave en regulación de la defensa contra patógenos, tales como *PR-1*, *WRKY29*, *PAL2*, entre otros. Para ello, mediante la fusión de la dCas9 con reguladores epigenéticos (p. ej., HATs y HMTs), estos autores proponen introducir marcas epigenéticas ampliamente asociadas a un estado de la cromatina transcripcionalmente activa en los residuos lisina de las colas N-terminales de las histonas ubicadas sobre las regiones promotoras de los genes de defensa de interés. En lo que respecta a los reguladores epigenéticos, estos deben estar vinculados tanto en la inducción de un estado activo de la cromatina como en la activación de genes de defensa en plantas (López-Calleja et al. 2019).

Entre los genes propuestos, por consiguiente, sobresalen las funciones de “*PATHOGENESIS-RELATED GENE 1*” y “*ARABIDOPSIS HOMOLOG OF TRITHORAX*” [*PR-1* (Breen et al. 2017; Martínez-Aguilar et al. 2021; Ramírez-Carrasco et al. 2017) y *ATXI* (Alvarez-Venegas y Avramova, 2005; Alvarez-Venegas et al. 2003), respectivamente], en la codificación

de proteínas con actividad antimicrobiana y enzimática modificadora de histonas, la proteína PR-1 y el modulador epigenético ATX1, respectivamente.

### **2.6.1 PR-1**

La proteína PR-1 pertenece a la familia de proteínas “PATHOGENESIS RELATED PROTEIN 1” (PR-1), las cuales son proteínas ubicuas en las especies vegetales y cuyas funciones se han asociado a la respuesta al estrés, así como el desarrollo vegetal (Breen et al. 2017). Durante la infección por patógenos, este grupo de proteínas son producidas de forma abundante, especialmente en el apoplasto y las vacuolas, por lo que se ha sugerido una posible función antimicrobiana (Breen et al. 2017; Jain y Khurana, 2018). Al respecto, estudios recientes han demostrado que las proteínas PR-1 pueden unirse a esteroides; además, albergan un péptido que actúa como molécula de señalización de la defensa e interactúan con efectores patogénicos durante la infección del hospedero (Breen et al. 2017). Pero la característica más distinguible de esta familia de proteínas es su síntesis en la defensa dependiente de ácido salicílico y su uso posterior como “marcador” de defensa en plantas (van Loon et al. 2006). En particular, el gen *PR-1* es usado ampliamente como gen marcador por ser extremadamente responsivo al *priming* (Díaz-Valle et al. 2019; Martínez-Aguilar et al. 2021), un fenómeno regulatorio caracterizado por la activación rápida y robusta de los mecanismos de defensa (Jung et al. 2009; Mauch-Mani et al. 2017).

### **2.6.2 ATX1-SET**

ATX1 es un modulador epigenético que participa en funciones pleiotrópicas, como el desarrollo, la organogénesis y la respuesta a diferentes tipos de estrés (Fromm y Avramova, 2014). En las regiones promotoras, ATX1 interactúa con otras proteínas para formar el complejo de pre-

iniciación de la transcripción (Ding et al. 2011). Sin embargo, su actividad catalítica modificadora de histonas es probablemente la función biológica más conocida de ATX1 (Alvarez-Venegas et al. 2003; Pien et al. 2008; Saleh et al. 2007). Al respecto, la H3K4me3 mediada por ATX1 (ATX1-H3K4me3) en la región promotora y codificante de los genes que regula, es una marca epigenética que se asocia a una regulación transcripcional activa y, en el caso específico de la región codificante, es requerida para la elongación de la transcripción (Ding et al. 2011; Ding et al. 2012). En lo que respecta a la respuesta a condiciones de estrés, varios estudios sugieren que, posterior a un período de estrés, ATX1-H3K4me3 juega un papel importante en el establecimiento de un estado transcripcional “permisivo” que resulta en la inducción de una respuesta inmune más eficaz ante un nuevo desafío (Alvarez-Venegas et al. 2007; Avramova, 2015; Conrath et al. 2015).

## **2.7 El tomate como organismo modelo**

En general, la precisa regulación transcripcional de la información genómica a través de la unión de la dCas9 con proteínas efectoras de funciones reguladoras distintas (p. ej., VP64 y ATX1-SET) es una novedosa estrategia de edición que proporciona un sistema de mejoramiento vegetal más rápido, preciso y económico que los sistemas tradicionales. Particularmente, la edición epigenómica vía CRISPRa plantea la posibilidad de desarrollar fenotipos de interés agronómico sin los riesgos que otros métodos de mejoramiento genético vegetal presuponen (Selma y Orzáez, 2021), como la generación de alteraciones genómicas involuntarias o la introducción de propiedades genéticas indeseables, por mencionar algunos. En la actualidad, sin embargo, el desarrollo de plantas tanto (epi)genética como transcripcionalmente editadas requiere de la introducción y expresión de los reactivos de edición (p. ej., los componentes moleculares del sistema CRISPRa) en la célula vegetal (Chen et al. 2019), lo cual está sujeto a condiciones

controladas y limitado un número reducido de especies capaces de ser transformadas y regeneradas *in vitro*. Al respecto, diferentes estrategias han sido desarrolladas con el propósito de generar plantas editadas, siendo los protocolos de integración de plásmidos a partir de la bacteria *A. tumefaciens* y equipos de biolística los métodos de transformación más adoptados (Chen et al. 2019; Ghogare et al. 2021). Estas estrategias, sin embargo, usan el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, por lo que las condiciones de regeneración y transformación genética (integración de plásmidos) tienen que ser previamente optimizadas para cada cultivo. En consecuencia, generar plantas con las ediciones deseadas suele ser un proceso laborioso (Altpeter et al. 2016), llegando incluso a ser considerado un trabajo artesanal.

Hoy en día, se han optimizado novedosos protocolos de transformación en plantas que comparten características propias de las plantas modelo y cultivables, tales como la capacidad de ser transformadas genéticamente y generar frutos de interés comercial. Este es el caso particular del tomate (*S. lycopersicum* L.) cv. Micro-Tom (Martí et al. 2006; Saito et al. 2011), el cual, además de crecer y reproducirse satisfactoriamente en cuartos de cultivo vegetal bajo luces fluorescentes y en altas densidades, así como poseer un ciclo de vida corto y capacidades de regeneración/transformación genética eficientes, produce frutos carnosos tipo baya de importancia agrícola, un rasgo que algunas plantas modelo clásicas como el arroz, el tabaco y *Arabidopsis* carecen (Shikata y Ezura, 2016). Por consiguiente, la transformación genética del tomate cv. Micro-Tom es un modelo útil para realizar estudios *in vivo* sobre cómo la activación transcripcional de genes de defensa endógenos, mediante CRISPRa, influye en rasgos agronómicos como el rendimiento y la calidad de los frutos, especialmente bajo condiciones de estrés por patógenos (Figura 3).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.



**Figura 3. Transformación genética del tomate cv. Micro-Tom para la activación transcripcional de genes endógenos asociados a la defensa en plantas vía CRISPRa.** (A) Los sistemas CRISPRa desarrollados, ya sea a partir de la fusión del complejo dCas9-sgRNA con un dominio activador de la transcripción o el dominio catalítico de un regulador epigenético, son ensamblados generalmente en un vector de transferencia de ADN o recubiertos en partículas de tungsteno u oro (microcarriers). (B) Posteriormente, estos son introducidos en las células de explantes vegetales cultivados *in vitro* a través de técnicas de transformación genética como la mediada por *A. tumefaciens* o la biolística, respectivamente. (C) Indistintamente de la integración transitoria o estable del material genético transfectado, los procesos de transcripción y traducción endógenos derivan en síntesis de los componentes moleculares del sistema CRISPRa. Al respecto, las fusiones proteicas funcionales sintetizadas (activadores transcripcionales programables o epifectores sintéticos basados en CRISPR) son dirigidas al locus genómico de interés, en donde el dominio regulador anexo a la dCas9 estimula la transcripción mediante el reclutamiento y estabilización de diversos componentes regulatorios de la maquinaria transcripcional eucariota. Para el análisis de expresión transitoria, algunos explantes son colectados, procesados y analizados a través de la prueba de RT-qPCR. Esto con el propósito de validar la funcionalidad y especificidad de los sistemas CRISPRa diseñados en activar la expresión del gen de defensa deseado. (D) En cuanto a su integración estable y expresión constitutiva, las células vegetales transformadas son seleccionadas a través de marcadores genéticos (p. ej., genes de resistencia a antibióticos o herbicidas presentes en los vectores binarios) y regeneradas en plantas completas mediante técnicas de propagación *in vitro*, como la organogénesis o la embriogénesis somática. (E-F) Finalmente, para evaluar su resistencia y capacidad de defensa respecto a plantas control, las plantas de tomate regeneradas son caracterizadas por medio de la prueba de PCR para posteriormente ser sometidas al ataque o infección controlada de patógenos e insectos. Figura elaborada en BioRender.com con ilustraciones amablemente diseñadas por la ilustradora Isaura Centurión de la Cruz (Figuras E y F). Adaptado de López-Calleja et al. (2019).

### III. Justificación

Pese a los avances en las herramientas de regulación transcripcional y de edición epigenética basados en el sistema CRISPRa, se han realizado pocos esfuerzos para integrar este sistema más allá de las plantas modelo. En consecuencia, con el objetivo de contribuir de manera significativa a la protección y al mejoramiento de cultivos, es necesario evaluar el sistema CRISPRa en plantas de importancia agrícola.

En general, la relevancia y la necesidad de este proyecto radica en la creciente demanda de investigaciones encaminadas a atender ejes nacionales e internacionales estratégicos, como lo es la sustitución de plaguicidas en el manejo de plagas y enfermedades agrícolas bajo el contexto del cambio climático. En este sentido, este trabajo busca integrar el sistema CRISPRa en el cultivo de tomate Micro-Tom con el fin de aportar conocimientos clave sobre la relación entre la activación inducida de genes de defensa y la resistencia a enfermedades en uno de los cultivos de mayor relevancia económica en México y en el mundo. Esta investigación beneficiará tanto a investigadores como a alumnos de posgrado de instituciones de investigación y de educación superior, al proporcionarles un producto biotecnológico (plantas editadas de tomate vía CRISPRa) para el estudio y la formulación de nuevas estrategias sostenibles de protección de cultivos basadas en control de la expresión genética. Asimismo, se espera que esta contribución impulse la innovación en la industria agrícola al ofrecer alternativas sostenibles y eficientes para el manejo del estrés biótico, contribuyendo así a la seguridad alimentaria y al desarrollo agrícola sostenible.

#### IV. Pregunta de Investigación

¿Es posible integrar los vectores dCas9-VP64 y dCas9-ATX1-SET del sistema CRISPRa en plantas transgénicas de tomate Micro-Tom por medio de la transformación genética mediada por *Agrobacterium*?

México.

de Tabasco.

## V. Hipótesis o Supuesto

La transformación genética mediada por *Agrobacterium* permitirá integrar y expresar constitutivamente los vectores: (a) dCas9-VP64 y (b) dCas9-ATX1-SET del sistema CRISPRa en plantas transgénicas de tomate Micro-Tom.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.

## **VI. Objetivo General**

Integrar los vectores binarios: (a) dCas9-VP64 y (b) dCas9-ATX1-SET del sistema CRISPRa, tanto de manera transitoria como estable, en explantes cotiledonares y de hipocótilo obtenidos a partir de plántulas de tomate Micro-Tom.

## **VII. Objetivo Específico**

A partir de la transformación estable, regenerar plantas editadas de tomate Micro-Tom que expresen de forma constitutiva las fusiones: (a) dCas9-VP64 y (b) dCas9-ATX1-SET del sistema CRISPRa.

## VIII. Métodos

### 8.1 Ubicación

Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Cromatina y Epigenética del Departamento de Ingeniería Genética del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), Unidad Irapuato, Guanajuato.

### 8.2 Composición y elaboración de medios

Los medios de cultivo *in vitro* empleados fueron (composición para 1 L):

1. Medio de germinación: medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 10% (v/v) de agua ahumada (Chumpookam et al. 2012), 15 g de sacarosa y 3 g de Gelrite (Sigma-Aldrich, Gelzan CM, Gelrite cat. # G1910), pH 5.8.
2. Medio de infección: medio basal MS suplementado con 1.2 g de sacarosa y 10  $\mu$ M de 2-mercaptoetanol, pH 5.8.
3. Medio de co-cultivo: medio basal MS suplementado con 30 g de sacarosa, 3 g de Gelrite y 1.5 mg de Zeatina, pH 5.8.
4. Medio de inducción de callo: medio basal MS suplementado con 30 g de sacarosa, 3 g de Gelrite, 1.5 mg de Zeatina, 400 mg de augmentine (400 mg de amoxicilina + 125 mg de ácido clavulánico) y 10 mg de higromicina, pH 5.8.
5. Medio de inducción de brotes: medio basal MS suplementado con 30 g de sacarosa, 3 g de Gelrite, 1 mg de Zeatina, 400 mg de augmentine (400 mg de amoxicilina + 125 mg de ácido clavulánico) y 10 mg de higromicina, pH 5.8.
6. Medio de elongación: medio basal MS suplementado con 30 g de sacarosa, 3 g de Gelrite, 0.1 mg de Zeatina, 400 mg de augmentine (400 mg de amoxicilina + 125 mg de ácido clavulánico) y 10 mg de higromicina, pH 5.8.
7. Medio de enraizamiento: medio basal MS a la mitad de su concentración suplementado con 15 g de sacarosa, 3 g de Gelrite, 400 mg de augmentine (400 mg de amoxicilina + 125 mg de ácido clavulánico) y 5 mg de higromicina, pH 5.8.
8. Medio de crecimiento y selección para *A. tumefaciens*: medio Luria-Bertani (LB) (Wise et al. 2006) suplementado con 100 mg de carbenicilina; 50 mg de rifampicina; 50 mg de kanamicina, pH 7.

Los medios de cultivo enlistados fueron proporcionados por el Dr. José Luis Cabrera Ponce (del Laboratorio de Transformación Genética de Plantas, CINVESTAV, Unidad Irapuato). Una vez facilitados, estos fueron esterilizados en autoclave (a 121°C por 20 min) y acondicionados según Shikata y Ezura, (2016), para los medios del 1 al 7, y según Wise et al. (2006) solo para el medio 8.

### **8.3 Material biológico**

Se usaron semillas de tomate cv. Micro-Tom (www.molesseeds.com, catálogo # VTO325) provenientes de plantas cultivadas en macetas de 3 L con sustrato estéril (mezcla de vermiculita con suelo en relación 1:1 v/v) bajo un esquema de riego (250 a 300 ml por planta, tres veces por semana) y fertilización manual (1.5 g/L del fertilizante Ferviafol®, una vez por semana). Estas plantas se desarrollaron en condiciones de luz natural (14 h de luz; 10 h de oscuridad) y experimentaron temperaturas máximas y mínimas promedio de 25 y 20 °C, respectivamente, dentro de un invernadero tipo capilla de ala ancha ubicado en Guanajuato, México (20° 43' 08" LN, 101° 19' 42" LO, 1730 msnm) (Figura 4).

#### **8.3.1 Desinfección de semillas**

Bajo condiciones de asepsia, alrededor de 100 semillas de tomate cv. Micro-Tom fueron introducidas en tubos Eppendorf de 1.5 ml (alrededor de 20 semillas por tubo). Inicialmente, se aplicó 1 ml de etanol al 70 %, seguido de una agitación suave durante 15 s (de manera manual o mediante vortex), permitiendo una breve incubación de 5 min antes de decantar el sobrenadante. Luego, se procedió a añadir 1 ml de cloro comercial (Cloralex®) al 20 % (v/v), junto con una gota de Tween 20, seguido de una agitación similar y una pausa de 15 min antes de decantar el

sobrenadante nuevamente. Posteriormente, se realizaron lavados con agua destilada estéril hasta que no se observaron burbujas, indicando así la correcta eliminación de cloro y Tween 20. Finalmente, se adicionó 1 ml de agua ahumada estéril a cada tubo, en donde las semillas permanecieron en reposo durante 24 h a temperatura ambiente.



**Figura 4. Planta de tomate (*S. lycopersicum* L.) cv. Micro-Tom.**

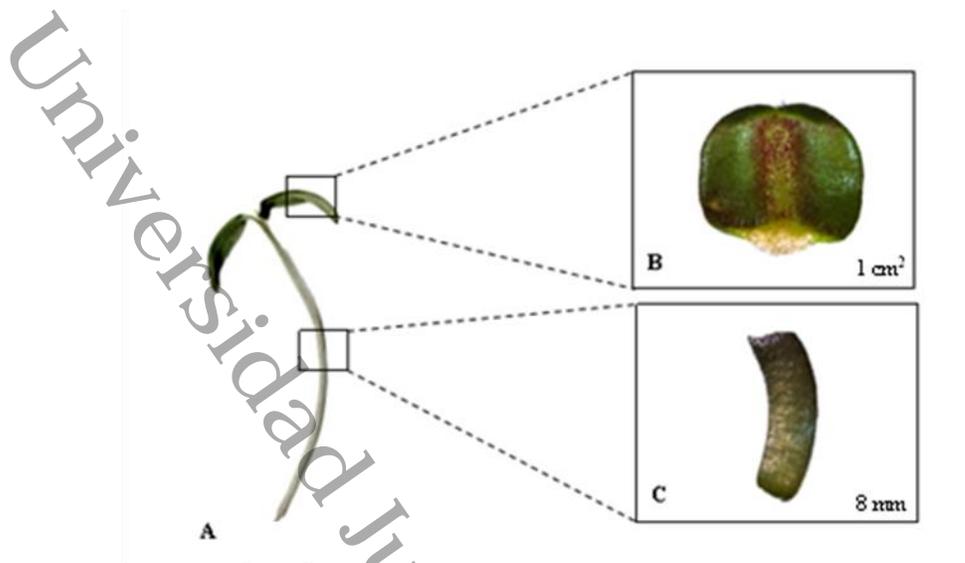
### **8.3.2 Germinación**

Las semillas desinfectadas fueron depositadas en una placa Petri estéril de vidrio (145 x 17 mm, Pyrex Bottom) sobre la cual se les removió el mucílago con ayuda de una pinza. Para evitar que las semillas perdieran humedad durante este procedimiento, se añadió 10 ml de agua destilada estéril sobre la placa Petri. Posteriormente, las semillas fueron sembradas en cajas Petri de plástico (90 x 15 mm, Phoenix biomedical products), 12 semillas por placa, con medio de germinación (medio basal MS suplementado con 10% (v/v) de agua ahumada, 15 g de sacarosa y 3 g de Gelrite,

pH 5.8) sobre las que permanecieron incubadas entre 8 a 12 días en una cámara de crecimiento tipo Percival (Percival AR-36, Percival, Perry, IA, EE. UU.) a 22 °C con un fotoperiodo de 16/8 h (luz y oscuridad, respectivamente) (irradiancia 50  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ , mediante lámparas fluorescentes tipo T8 Phillips P32T8/TL850) para inducir su germinación.

### 8.3.3 Obtención de explantes

Después de haber germinado, las plántulas fueron extraídas y diseccionadas con ayuda de una pinza y un bisturí sobre una placa Petri estéril de vidrio, una plántula a la vez. De acuerdo con Shikata y Ezura, (2016), los extremos distales y la parte media de cada cotiledón fueron seccionados transversalmente. Por su parte, los hipocótilos se cortaron por debajo de la yema apical hasta la parte media del hipocótilo en secciones de aproximadamente 8-10 mm de longitud (Figura 5). En total, se obtuvieron 4 explantes cotiledonares de aproximadamente 1  $\text{cm}^2$  (2 por cada cotiledón) y 4 de hipocótilo por plántula. Un estimado de 200 explantes de cotiledón y de hipocótilo fueron preparados (400 en total). Para evitar la pérdida de humedad del tejido vegetal previo a su inoculación con *Agrobacterium*, los explantes seccionados fueron transferidos momentáneamente a cajas Petri de plástico con el medio de co-cultivo (medio basal MS suplementado con 30 g de sacarosa, 3 g de Gelrite y 1.5 mg de Zeatina, pH 5.8) a medida que estos iban siendo obtenidos.



**Figura 5. Obtención de explantes de cotiledón e hipocótilo.** A) plántula de tomate cv. Micro-Tom 8 días posteriores a su germinación. (B) explante de cotiledón. (C) explante de hipocótilo.

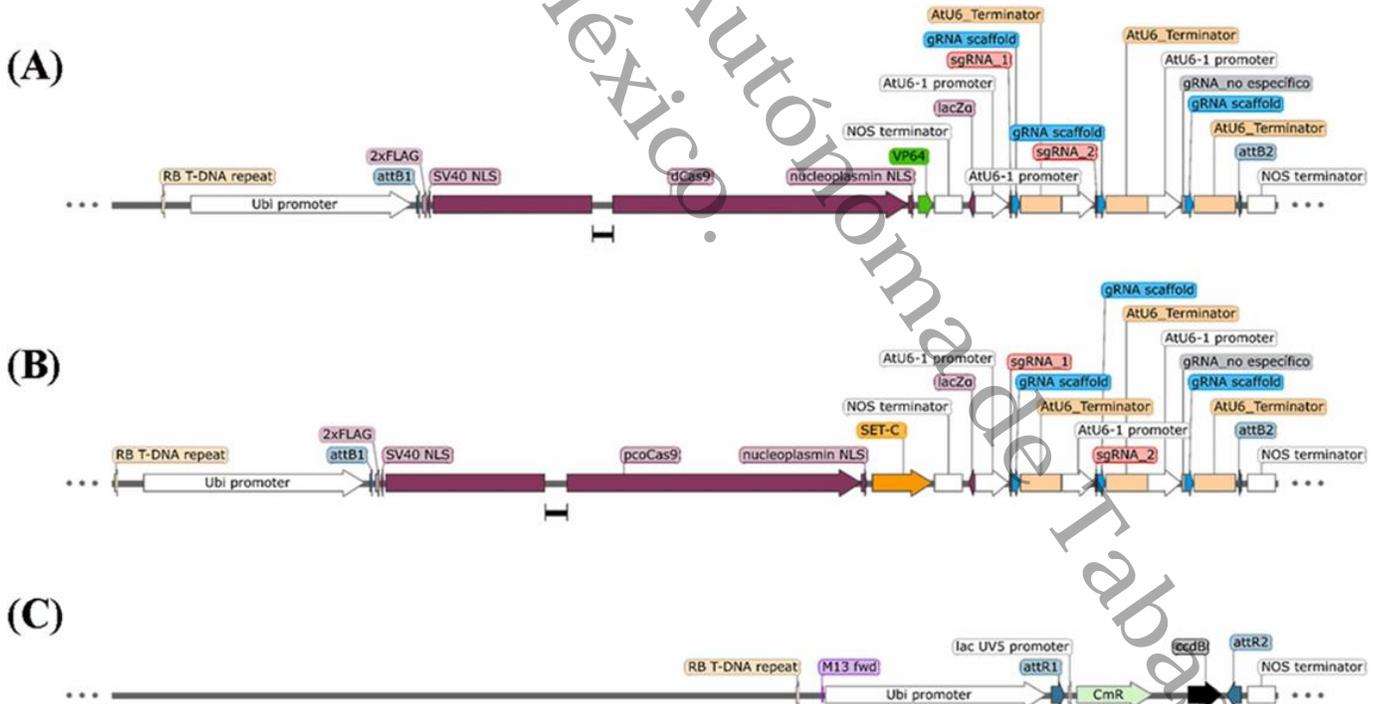
#### 8.4 Vectores CRISPRa

Con el propósito de activar la transcripción del gen *SIPR-1* (ortólogo del gen *PR-1* de *A. thaliana*) en plantas de tomate cv. Micro-Tom vía CRISPRa, dos vectores binarios de transferencia de ADN (T-DNA) fueron elaborados por el Dr. Juan Carlos Vizuet de Rueda (posdoctorante en el Laboratorio de Cromatina y Epigenética del CINVESTAV, Unidad Irapuato) partir de los sistemas desarrollados por Lowder et al. (2015): los vectores denominados M12 y ST4, correspondientes a las construcciones: (a) 203-dCas9-VP64 + sgRNA y (b) 203-dCas9-ATX1-SET + sgRNA, respectivamente (Figura 6). Estos vectores están conformados por el vector binario pYPQ203 y consisten en: (a) el dominio transactivador VP64 y (b) el dominio catalítico SET del gen de tomate *SlATX1*, gen ortólogo de la histona H3 lisina 4 tri-metiltransferasa —H3K4me3— *ATX1* de *A. thaliana* (Alvarez-Venegas et al. 2003), fusionados en el extremo C- terminal de la dCas9, cada uno con su respectivo ARN guía correspondiente a la región promotora del gen *SIPR-1* (*Soly01g106620.2*). Además, como control de los vectores CRISPRa, se utilizó el vector vacío

pYPQ203, el cual fue nombrado como 203 (Figura 6C). Para una descripción detallada del diseño y la construcción de los vectores, consultar a García-Murillo et al. (2023).

### 8.5 Líneas de *A. tumefaciens*

Cada uno de los vectores recombinantes generados (Figura 6) fue utilizado para transformar a la cepa GV2260 de *A. tumefaciens* a través del método de electroporación descrito por Weigel y Glazebrook (2006). En total, dos líneas de *A. tumefaciens* portadoras de los vectores M12 (203-dCas9-VP64 + sgRNA) y ST4 (203-dCas9-ATX1-SET + sgRNA) fueron desarrolladas. A manera de control, además, se optó por utilizar líneas de *Agrobacterium* GV2260 portadoras del vector 203 (vector vacío pYPQ203) y sin transformar (línea C-).



**Figura 6. Vectores CRISPRa.** (A) M12 (203-dCas9-VP64 + sgRNA); (B) ST4 (203-dCas9-ATX1-SET + sgRNA); y (C) 203 (vector vacío pYPQ203). Figura tomada de García-Murillo et al. (2023).

### 8.5.1 Cultivo de *A. tumefaciens*

Dos días previos a la obtención de los explantes de cotiledón e hipocótilo, cada una de las líneas de *Agrobacterium* previamente generadas fue cultivada por separado a partir de una colonia única en un tubo tipo falcón con 20 ml de medio de crecimiento y selección para *A. tumefaciens* (medio LB suplementado con 100 mg de carbenicilina, 50 mg de rifampicina, 50 mg de kanamicina, pH 7). Para la línea C- de *A. tumefaciens* no se usaron antibióticos. Posteriormente, cada muestra fue incubada con agitación constante (Gyromax 838, Amerex Instruments, Inc.) a 240 repeticiones por min (rpm) en un cuarto oscuro a 28 °C. Entre 24 y 36 h después, se tomó una alícuota de 1 ml de cada medio a partir de la cual se determinó la densidad óptica a 600 nm de longitud de onda (OD<sub>600</sub>) (espectrofotómetro SV1600 Vis Azzota Co.). Una vez que las bacterias alcanzaron una OD de 0.6, se procedió a centrifugar el cultivo bacteriano de cada tubo (a 3500 rpm por 5 min a temperatura ambiente), descartar el sobrenadante y resuspender el pellet con 25 ml de medio de infección (medio basal MS suplementado con 1.2 g de sacarosa y 10 µM de 2-mercaptoetanol, pH 5.8).

### 8.5.2 Inoculación y co-cultivo

Bajo condiciones de asepsia, los medios de infección previamente establecidos fueron vertidos individualmente en vasos de precipitado estériles de 50 ml y clasificados según la línea de *A. tumefaciens* en resuspensión (las líneas C-, 203, M12 y ST4). Alrededor de 40 explantes de cotiledón y de hipocótilo fueron transferidos a un vaso de precipitado junto con la suspensión bacteriana correspondiente a cada una de las líneas de *Agrobacterium*. A modo de control (WT), otros 40 explantes de cotiledón y de hipocótilo fueron transferidos a un vaso de precipitado con medio líquido de infección sin bacterias (medio basal MS suplementado con 1.2 g de sacarosa y

10  $\mu\text{M}$  de 2-mercaptoetanol, pH 5.8). Transcurridos 5 min, los explantes fueron retirados de los medios de infección con y sin bacterias, colocados sobre Sanitas estériles (para remover el exceso de humedad por absorción) y transferidos a cajas Petri de plástico con medio de co-cultivo (medio basal MS suplementado con 30 g de sacarosa, 3 g de Gelrite y 1.5 mg de Zeatina, pH 5.8). La transferencia de los explantes se realizó de las siguientes dos formas: (a) con el lado adaxial (el haz) en contacto directo con el medio y (b) sin posición específica, para cotiledones e hipocótilos, (a) y (b), respectivamente. En total, alrededor de 20 explantes fueron cultivados por caja Petri, cotiledones e hipocótilos por separado. Las placas con los explantes fueron selladas con papel Parafilm y almacenadas en un cuarto oscuro a 21 °C por 48 h.

## 8.6 Transformación transitoria

Transcurridas 48 h, únicamente explantes de cotiledón previamente inoculados, 12 por cada una de las líneas *A. tumefaciens* (las líneas C-, 203, M12 y ST4) y 12 sin inocular (WT), fueron transferidos individualmente a cajas Petri de plástico con medio de inducción de callo sin higromicina (medio basal MS suplementado con 30 g de sacarosa, 3 g de Gelrite, 1.5 mg de Zeatina y 400 mg de augmentina, pH 5.8) en posición adaxial en contacto directo con el medio. Las placas Petri con los explantes (5 placas en total, 12 explantes por placa) fueron selladas con papel Parafilm y almacenadas en una cámara de crecimiento tipo Percival a 22 °C con un fotoperiodo de 16/8 h (luz y oscuridad, respectivamente) (irradiancia 50  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ). A los 8, 16 y 24 días posteriores a la infección (DPI) con *Agrobacterium*, se documentó el desarrollo de los explantes a través de fotografías tomadas con un microscopio estereoscópico (Leica EZ4 D, Leica Microsystems). Durante el mismo periodo, se colectaron muestras para su posterior análisis a través de la prueba

de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).

## 8.7 Transformación estable

Análogamente, para seleccionar eventos de transformación estable, explantes de cotiledón y de hipocótilo fueron transferidos a cajas Petri de plástico con medio de inducción de callo con higromicina (medio basal MS suplementado con 30 g de sacarosa, 3 g de Gelrite, 1.5 mg de Zeatina, 400 mg de augmentine y 10 mg de higromicina, pH 5.8). Los cotiledones con el lado adaxial en contacto directo con el medio y los hipocótilos sin posición específica. Entre 20 a 25 explantes por caja Petri, cotiledones e hipocótilos por separado. Las placas con los explantes fueron selladas con papel Parafilm y almacenadas en una cámara de crecimiento tipo Percival a 22 °C con un fotoperiodo de 16/8 h (luz y oscuridad, respectivamente) (irradiancia 50  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ). Cada 10 días, los explantes fueron retransferidos a nuevas cajas Petri con medio de inducción de callo hasta la aparición de distintos tipos de estructuras (p. ej., órganos, callos y embriones somáticos) resistentes a higromicina. Para los explantes inoculados con la línea C- de *Agrobacterium*, así como para aquellos sin inocular (WT), se utilizaron medios con y sin higromicina. Al respecto, aquellos expuestos a higromicina eventualmente fueron desechados, mientras que los que no fueron expuestos a este componente continuaron con su proceso de regeneración *in vitro* por separado, sin el uso de higromicina en los medios de cultivo posteriores. El proceso de regeneración se documentado con fotografías tomadas con un microscopio estereoscópico Leica.

### 8.7.1 Inducción de brotes

Para acelerar el desarrollo de los brotes, callos y embriones obtenidos, estos fueron transferidos a frascos de vidrio (7 cm de altura x 6 cm de diámetro) con el medio de inducción de brotes (medio basal MS suplementado con 30 g de sacarosa, 3 g de Gelrite, 1 mg de Zeatina, 400 mg de augmentine y 10 mg de higromicina, pH 5.8) e incubados en una cámara de crecimiento tipo Percival a 22 °C con un fotoperiodo de 16/8 h (luz y oscuridad, respectivamente) (irradiancia 50  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$ ). Cada 10-15 días, los tejidos transformados fueron retransferidos a nuevos frascos (entre 6 a 7 explantes por frasco) con el mismo medio de cultivo.

### **8.7.2 Elongación de brotes y enraizamiento**

Cuando los tallos del tejido regenerado estuvieron bien definidos, los brotes fueron separados unos de otros para promover aún más su desarrollo. Los brotes, todavía unidos a un callo o al tejido transformado, fueron transferidos a frascos de vidrio con el medio de elongación (medio basal MS suplementado con 30 g de sacarosa, 3 g de Gelrite, 0.1 mg de Zeatina, 400 mg de augmentina y 10 mg de higromicina, pH 5.8) e incubados en una cámara de crecimiento tipo Percival a 22 °C con un fotoperiodo de 16/8 h (luz y oscuridad, respectivamente) (irradiancia 50  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$ ). Cada 10-15 días, los brotes fueron retransferidos a nuevos frascos (tres brotes por frasco) con el mismo medio de cultivo. Una vez que los brotes alcanzaron al menos 3-4 cm de altura, se procedió a extraerlos lo más finamente posible del tejido al que estaban unidos para posteriormente ser cultivados en cajas tipo magenta (10.16 cm de altura x 7.62 cm de diámetro). Cada brote o embrión maduro fue transferido individualmente al medio de enraizamiento (medio basal MS a la mitad de su concentración suplementado con 15 g de sacarosa, 3 g de Gelrite, 400 mg de augmentine y 5 mg de higromicina, pH 5.8) y almacenado bajo las mismas condiciones por un mes.

### **8.7.3 Aclimatación de plantas regeneradas**

Cuando los brotes o embriones desarrollaron raíces laterales y terciarias de entre 5 a 6 cm y de 1 a 2 cm de longitud, respectivamente, se extrajeron cuidadosamente las plántulas del medio de enraizamiento, sus raíces lavadas con agua destilada estéril y trasplantadas en macetas de 2.3 L con sustrato estéril (mezcla de vermiculita con suelo en relación 1:1 v/v) previamente humedecido, una planta por maceta. Para mantener una humedad alta, las plantas fueron cubiertas con una bolsa de polietileno transparente y transferidas a una cámara de crecimiento tipo Percival a 22 °C con un fotoperiodo de 16/8 h (luz y oscuridad, respectivamente) (irradiancia 50  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$ ). Paulatinamente, se realizaron pequeños agujeros a la bolsa, para aclimatar a las plantas, hasta que ésta no fue necesaria. Durante este proceso, las plantas fueron regadas de dos a tres veces por semana (de 150 a 200 ml por planta) y fertilizadas con Ferviafol® (1.5 g/L del fertilizante) una vez a la semana.

### **8.7.4 Obtención, clasificación y almacenamiento de semillas provenientes de plantas regeneradas *in vitro***

Para validar la integración y expresión de los vectores recombinantes en el genoma vegetal, las plantas de tomate Micro-Tom regeneradas a partir del cultivo *in vitro* de cotiledones e hipocótilos se clasificaron en relación con el tratamiento al que estos tejidos estuvieron sometidos (WT, C-, 203, M12 y ST4). Posteriormente, se realizaron polinizaciones manuales y las semillas resultantes se almacenaron a -20 °C para su posterior genotipificación a través de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

## **IX. Resultados**

### **9.1 Generación de líneas de *A. tumefaciens* portadoras de los vectores CRISPRa**

Para evaluar la funcionalidad de los vectores CRISPRa diseñados en reprogramar el estado epigenético y activar la expresión del gen *SIPR-1* (consultar metodología), primero es necesario expresar los componentes moleculares del sistema CRISPRa en las células somáticas del tomate de manera permanente o temporal (Figura 3). En este sentido, de entre los métodos tradicionales de transformación genética de plantas, se consideró que la transformación genética mediada por la bacteria *A. tumefaciens* permitiría integrar y expresar los vectores CRISPRa denominados como M12 (203-dCas9-VP64 + gR1-2) y ST4 (203-dCas9-SET + gR1-2). Por tanto, se transformó la cepa GV2260 de *Agrobacterium* con los vectores binarios previamente diseñados (M12 y ST4), obteniendo de esta forma las líneas bacterianas a partir de las cuales se desarrollarían los experimentos de transformación transitoria y estable de los explantes de cotiledón e hipocótilo. Como líneas control, además, se utilizó la cepa portadora del vector vacío (203) y la cepa GV2260 sin transformar (C-).

### **9.2 Efecto de la transformación transitoria sobre los explantes cotiledonares**

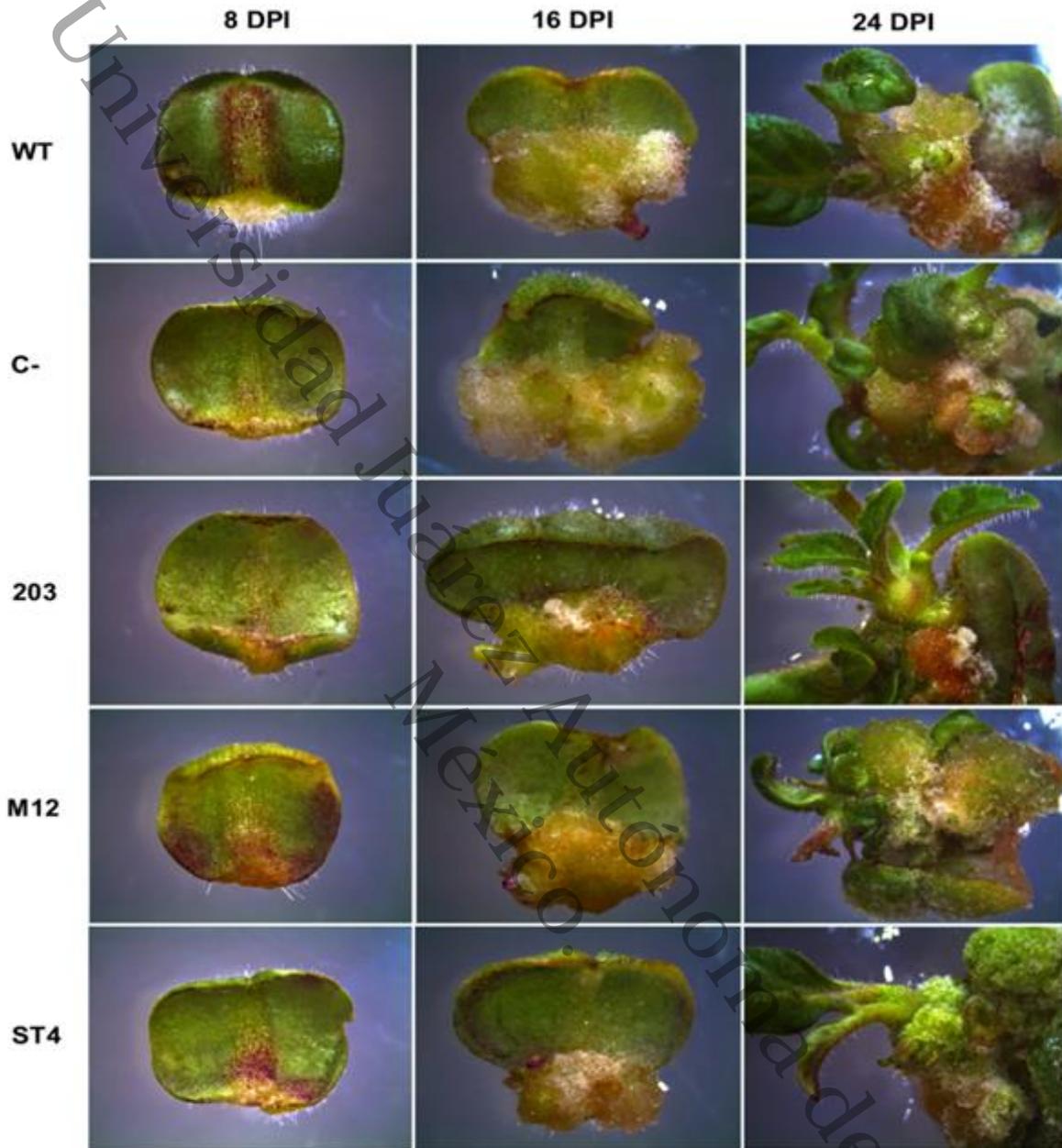
A continuación, los explantes de cotiledón fueron transformados de manera transitoria. Primero, los explantes cotiledonares fueron infectados con las suspensiones bacterianas correspondientes a las líneas de *Agrobacterium* desarrolladas (C-, 203, M12 y ST4). Además de los controles 203 y C-, se incluyó el control WT, el cual estuvo conformado por explantes que no fueron inoculados.

Con el fin de favorecer eventos de transformación transitoria, todos los cotiledones fueron transferidos a medios de inducción de callo sin higromicina por 24 días. Durante este periodo, se

recogieron muestras a los 8, 16 y 24 días después de la infección con *Agrobacterium* (DPI). Como se muestra en la Figura 7, no se observaron cambios fenotípicos en ninguno de los tratamientos dentro de los primeros 8 días DPI. Sin embargo, indistintamente si habían sido expuestos a *A. tumefaciens* o no, para el día 16 DPI todos los explantes habían formado callos en dirección hacia donde una vez estuvo el meristemo apical, y para el día 24 DPI, todos los callos desarrollaron órganos. Además, no hubo contaminación bacteriana durante el desarrollo del experimento. Por lo tanto, la presencia de zeatina en el medio de inducción de callo promovió la organogénesis por igual, tanto en explantes infectados como los no infectados, a su vez que la elaboración de estos medios con augmentina previno una posible reinfección de *Agrobacterium* en los cotiledones transformados. Finalmente, por las limitaciones de tiempo de este estudio, los explantes fueron congelados a -80 °C para su posterior análisis mediante RT-qPCR.

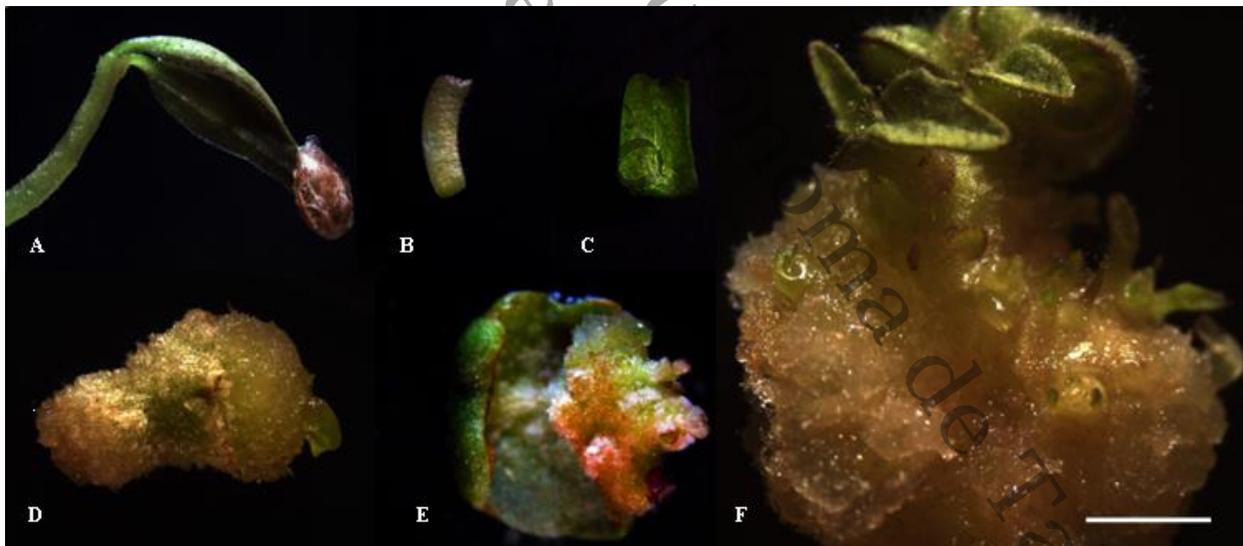
### **9.3 Cultivo *in vitro* y transformación genética del tomate Micro-Tom**

Seguido a los ensayos de transformación transitoria, se generó un conjunto de plantas editadas y sin editar. De manera similar, los explantes de Micro-Tom fueron infectados con las líneas C-, 203, M12 y ST4 de *Agrobacterium*, solo que esta vez se incorporaron explantes tanto de cotiledón como de hipocótilo. A modo de control WT, además, se empleó explantes que no fueron expuestos a ninguna línea bacteriana.



**Figura 7. Explantes cotiledonares a los 8, 16 y 24 días posteriores a la infección (DPI) con *Agrobacterium*.** WT: explantes sin infectar; C-: explantes infectados con la línea control (cepa GV2260 sin transformar); 203: explantes infectados con la línea 203 (cepa GV2260 transformada con el vector vacío pYPQ203); M12: explantes infectados con la línea M12 (cepa GV2260 transformada con el vector 203-dCas9-VP64 + gRNAs); ST4: explantes infectados con la línea ST4 (cepa GV2260 transformada con el vector 203-dCas9-SET + gRNAs).

A continuación, para favorecer la regeneración de plantas sin editar, los explantes inoculados con las suspensiones correspondientes a los tratamientos C- (línea GV2260 sin transformar) y WT (sin bacteria) fueron subcultivados cada 10 días en medios de inducción de callo con y sin higromicina. En concordancia con lo observado en la Figura 7, tanto los explantes inoculados como aquellos sin inocular desarrollaron callos y órganos en ausencia de higromicina dentro de las primeras tres semanas de cultivo *in vitro*. Como se aprecia en la Figura 8 D-F, los explantes de cotiledón e hipocótilo desarrollaron meristemos, tallos y hojas a partir de callos, siendo esto un indicador de la organogénesis indirecta. Por otra parte, ninguno de los explantes expuestos a higromicina logró sobrevivir más de 3 semanas en presencia del antibiótico. Además, durante este tiempo tampoco se observó la inducción de callos u órganos en estos explantes (ANEXOS; Figura 12 D-E), por lo que se confirmó la efectividad del medio de selección.

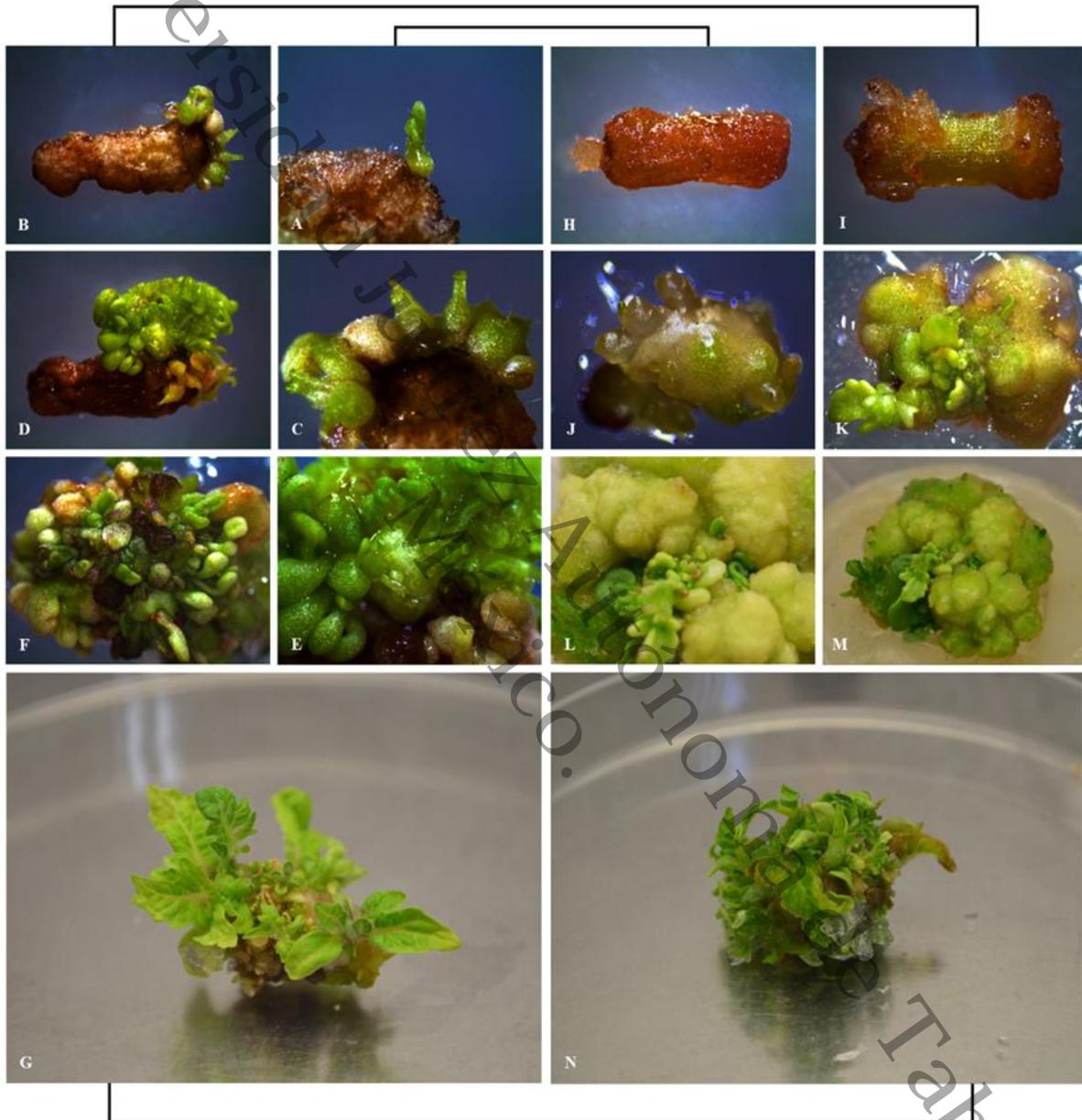


**Figura 8. Inducción de la organogénesis indirecta. (A) Plántula de Micro-Tom. (B) Explante de hipocótilo. (C) Explante de cotiledón. (D-E) Inducción de callo y meristemos en explantes de hipocótilo y cotiledón, respectivamente. (F) Inducción de órganos (meristemos, tallos y hojas). La barra de escala representa 1 cm.**

Simultáneamente, para generar eventos de transformación estable, otro grupo de explantes de cotiledón e hipocótilo expuestos a los tratamientos antes descritos (WT, C-, 203, M12 y ST4), fue subcultivado en medios de inducción de callo con higromicina durante dos meses. De manera consistente, ninguno de los explantes expuestos a los tratamientos WT y C- sobrevivió en presencia del marcador de selección. Solo unos cuantos explantes de hipocótilos derivados de los tratamientos 203, M12 y ST4 lograron producir estructuras resistentes a higromicina, siendo esto un indicador la integración y expresión de los vectores binarios, así como de la generación de eventos transgénicos. Sin embargo, en contraste con la respuesta morfogénica hasta entonces obtenida (Figura 8 D-F), se indujo también la embriogénesis somática indirecta cuando los explantes de hipocótilo infectados con *Agrobacterium* (líneas 203, M12 y ST4) fueron subcultivados en medios de inducción de callo con sus respectivos antibióticos. Por consiguiente, la combinación del estrés inducido por *A. tumefaciens* junto con la presencia de zeatina, sacarosa y antibióticos favoreció la embriogénesis somática. No obstante, ambas respuestas morfogénicas estuvieron presentes durante la selección de los eventos transgénicos (Figuras 9 y 10).

Sorpresivamente, se observaron diferencias fenotípicas en la inducción de la organogénesis cuando los explantes de hipocótilo fueron seleccionados *in vitro*. Como se observa en la Figura 9, mientras que los hipocótilos transformados con la línea M12 de *Agrobacterium* desarrollaron órganos a partir de callos (Figura 9 H-N), algunos de los explantes transformados con la línea ST4 produjeron órganos directamente del tejido transformado (Figura 9 A-G), dando como resultado un fenotipo arbustivo (“*bushy phenotype*”) (Figura 9 E-F). Este tipo de respuesta morfogénica es referida como organogénesis directa, ya que prescinde de la callogénesis en la regeneración de órganos vegetales (Cardoza, 2008). En el caso de la embriogénesis somática, los embriones se

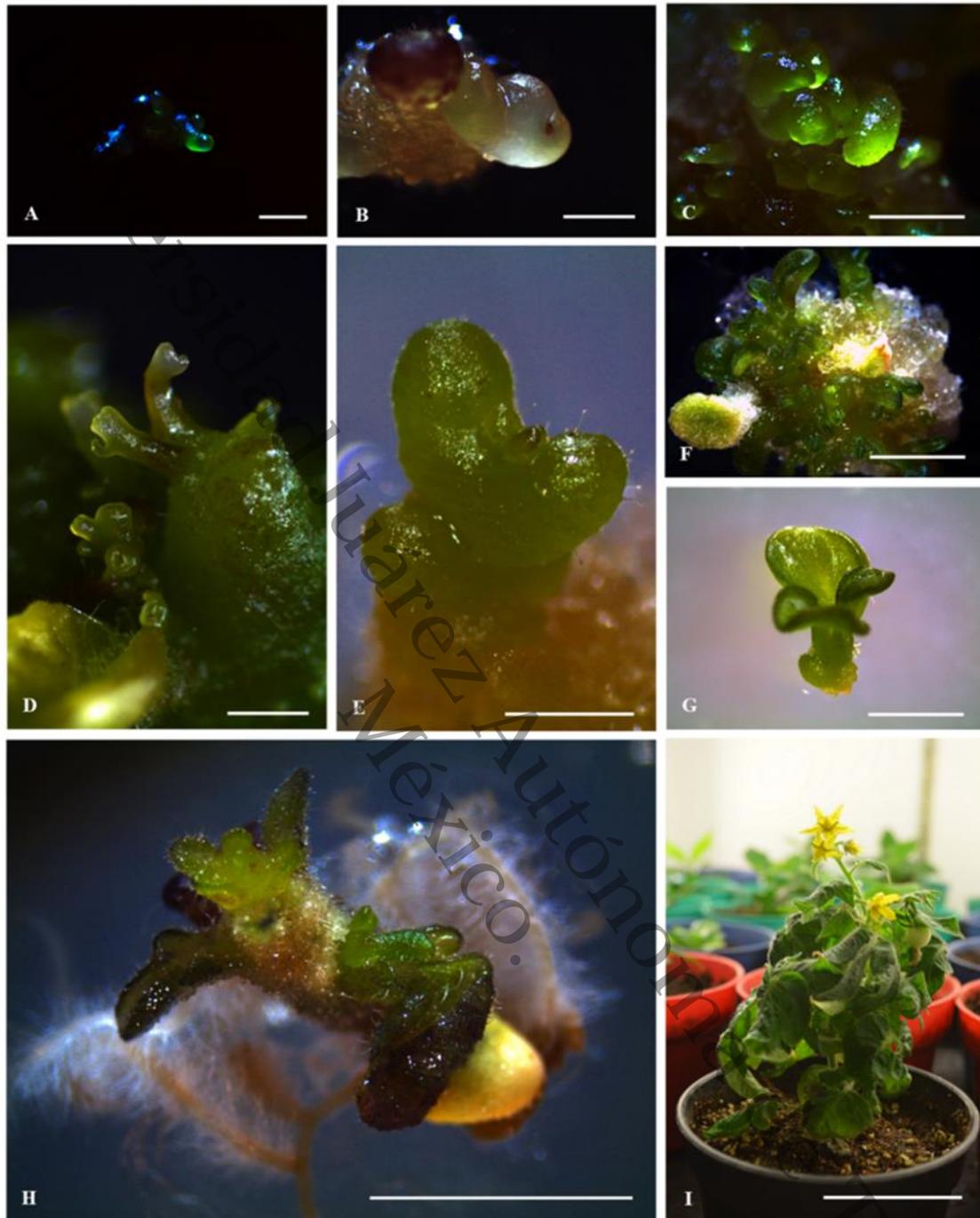
indujeron únicamente a partir de callos (Figura 10 A-I), de allí que se le conozca como embriogénesis somática indirecta (Cardoza, 2008; Fehér, 2019).



**Figura 9. Diferencias fenotípicas observadas entre las líneas transgénicas transformadas con los vectores ST4 y M12. (A-G) Inducción de organogénesis directa (sin generación de callo) e indirecta (H-I) en tejido transgénico regenerado *in vitro*, transformado con los vectores ST4 (203-dCas9-SET + gRNAs) y M12 (203-dCas9-VP64 + gRNAs), respectivamente. Las imágenes fueron ordenadas a modo espejo y unidas por líneas para facilitar la comparación entre ambos tratamientos en sus diferentes etapas de desarrollo.**

En general, durante las primeras 6 a 10 semanas DPI se observaron estructuras en fase globular, corazón y torpedo en el tejido embrionario (Figura 10 A-D), así como órganos y callos en los extremos de los hipocótilos (Figura 9 A-C, H-J). Una vez que los embriones estuvieron en fase cotiledonaria fueron transferidos al medio de inducción de brotes para promover su maduración y crecimiento (Figura 10 E-F). Durante los dos meses siguientes, se consideraron maduros aquellos embriones que se desprendían fácilmente del callo al que estaban unidos y que mostraban hojas verdaderas (Figura 10 G). Estos embriones aún conservaban su estructura en forma de suspensor en la base, por lo que fueron transferidos al medio de enraizamiento para que pudieran crecer sus raíces. En cuanto al tejido organogénico, los órganos inducidos directa e indirectamente del tejido transformado fueron subcultivados en el medio de inducción de brotes hasta la aparición de hojas (Figura 9 D-F, K-M) y posteriormente se transfirieron al medio de elongación. Cuando los brotes se alargaron (Figura 9 G, N), estos fueron separados y subcultivados en el medio de enraizamiento hasta la aparición de raíces. Una vez enraizadas, todas las plántulas regeneradas (incluido los controles C- y WT no expuestos a higromicina) fueron transferidas a condiciones suelo, y se les proporcionó el ambiente necesario para su crecimiento y fructificación (Figura 10 H-I).

En conjunto, el desarrollo de plantas resistentes a higromicina mediante la inducción de órganos y embriones somáticos en explantes de hipocótilo transformados con *Agrobacterium* (líneas M12 y ST4), confirma la hipótesis establecida.



**Figura 10. Embriogénesis somática del cultivo de tomate cv. Micro-Tom.** (A) Inducción de embriones somáticos en fase globular. (B) Fase de embrión somático en forma de corazón. (C) Embriones somáticos en fase temprana de torpedo. (D) Embriones somáticos en fase de torpedo e inducción temprana de cotiledones. (E) Embrión somático en fase cotiledonaria mostrando estructura en forma de suspensor y primordios foliares. (F) Callo embriogénico con embriones somáticos maduros. (G-H) Conversión en plántulas, aparición de las primeras hojas verdaderas y enraizamiento. (I) Enmacetado y aclimatación. Las barras de escala representan 1 mm (A), 3 mm (B), 5 mm (C-E), 1 cm (F-G), 3 cm (H) y 5 cm (I), respectivamente.

## X. Discusión

Con el objetivo de integrar los componentes moleculares del sistema CRISPRa en el cultivo de tomate Micro-Tom, primero se realizó un ensayo de transformación transitoria a partir de explantes cotiledonares cultivados *in vitro* en donde fue posible validar la trans-diferenciación celular de las células somáticas del tomate en callos y órganos, así como la eliminación de *Agrobacterium* de los medios de cultivo. Posteriormente, a partir de la transformación estable de explantes vegetales, se logró en producir plantas editadas epigenéticamente (vía CRISPRa) por medio de la embriogénesis y organogénesis somática.

En general, los ensayos de expresión transitoria son una parte importante del proceso de validación de los vectores recombinantes antes de su integración en el ADN genómico vegetal. La transformación transitoria mediada por *Agrobacterium* (agroinfiltración) es probablemente el sistema de expresión transitoria más usado en plantas. Este permite producir proteínas recombinantes de manera rápida y escalable, así como estudiar su localización subcelular e interacciones con otras proteínas *in vivo* (Krenek et al. 2015). En el tomate, sin embargo, la inyección o infiltración de hojas con *Agrobacterium* puede inducir el necrosamiento del tejido infiltrado, por lo que solo unas cuantas cepas de *A. tumefaciens* son recomendadas para este propósito (Wroblewski et al. 2005). En consecuencia, primero desarrollamos una estrategia *in vitro* para transformar de manera transitoria explantes cotiledonares como una alternativa al método convencional por agroinfiltración. Este procedimiento permitió transformar de manera transitoria los explantes de tomate sin que se presentaran efectos negativos asociados a la inoculación de *Agrobacterium*. Además, mediante el uso de antibióticos [400 mg de amoxicilina + 125 mg de ácido clavulánico (expresado en mg/L<sup>-1</sup>)] se pudo inhibir su reaparición en los medios de cultivo. Esto es significativo, dado que en la mayoría de las investigaciones los análisis transitorios se

restringen a unos pocos días DPI como consecuencia de la muerte celular del tejido infectado (Wroblewski et al. 2005), a la inestabilidad inherente de las copias del T-DNA no integradas (Krenek et al. 2015) y por el silenciamiento génico mediado por ARN (Lacroix y Citovsky, 2013). Aunque por limitaciones de tiempo no fue posible realizar los análisis de RT-qPCR, los resultados obtenidos muestran que todos los explantes desarrollaron callos hacia el día 16 DPI seguido por la formación de órganos hacia el día 24 DPI, independientemente de la exposición a *A. tumefaciens* (Figura 7). A juzgar por los controles WT, C- y 203, esto sugiere que la inoculación con *Agrobacterium*, y por tanto la expresión transitoria de los vectores CRISPRa en los tratamientos M12 y ST4, no influyó en la formación inicial de callos ni en la posterior inducción de brotes *in vitro*. Recientemente, se modificó esta metodología al adoptar la técnica de transformación por biolística en lugar de *Agrobacterium*, obteniendo resultados significativos en análisis de expresión transitoria realizados hasta 24 días después de los eventos de transformación (García-Murillo et al. 2023).

En contraste con la expresión transitoria, la transformación estable inicia con la integración de los transgenes en el ADN genómico de las células vegetales (para una revisión detallada sobre la transformación genética de plantas, consulte a Finer y Dhillon 2008). Mientras que los métodos de transformación por biolística y *Agrobacterium* son vías especializadas para transferir ADN exógeno en el núcleo celular, factores como el tipo de explante utilizado, así como el balance óptimo de minerales, carbohidratos, fitohormonas y antibióticos en los medios de cultivo *in vitro*, desempeñan un papel crucial en la selección de eventos transgénicos (Lee-Yoon et al. 2018), la trans-diferenciación celular de las células somáticas transformadas y su posterior conversión en plantas completas (Cardoza, 2008). Por consiguiente, con el objetivo de producir plantas editadas de tomate vía CRISPRa (transformación estable), se utilizó una versión modificada de los

protocolos publicados por Shikata y Ezura, (2016) y Van Eck et al. (2019). Estos resultados demuestran que ambos vectores CRISPRa, M12 y ST4, se integraron de manera exitosa y se expresan constitutivamente en las plantas transgénicas de tomate producidas a partir de la transformación estable de hipocótilos, lo cual es consistente con la hipótesis del presente estudio y responde la pregunta de investigación establecida. Como se puede apreciar en las Figuras 9 y 10, el desarrollo de estructuras de tipo organogénica (directa e indirecta) y embriogénica resistentes a higromicina indica que las plantas regeneradas a partir de los explantes transformados con las líneas 203, M12 y ST4 de *Agrobacterium*, son transgénicas. Estas observaciones concuerdan con el hecho de que ni los explantes inoculados con la línea C- ni los controles WT lograron sobrevivir en presencia del antibiótico (que actúa como marcador de selección), permitiendo la discriminación efectiva entre explantes transformados y no transformados (ANEXOS; Figura 12 D-F). Sin embargo, aunque explantes de cotiledón como de hipocótilo fueron inoculados con *Agrobacterium*, solo fue posible generar plantas transgénicas a partir de los últimos. Esto se puede relacionar con la capacidad de trans-diferenciación celular de los segmentos de hipocótilos utilizados con respecto a los cotiledones (consultar metodología). En el tomate Micro-Tom, se ha observado que distintas secciones de un mismo explante presentan diferentes capacidades para la formación de órganos (Lee et al. 2020). Esta capacidad es mayor en los segmentos de los cotiledones e hipocótilos que se encuentran más próximos al meristemo apical. Adicionalmente, la orientación abaxial de los cotiledones (cuando el envés está en contacto directo con el medio) favorece la inducción de brotes hasta en un 90%, en comparación con un 45% cuando los cotiledones están en la posición adaxial, es decir, con el haz en contacto directo con el medio (Lee et al. 2020). Puesto que se utilizaron segmentos próximos y medios en el caso de los hipocótilos

(los más cercanos al meristemo apical) y la posición utilizada en los cotiledones fue adaxial, esto podría explicar por qué no fue posible generar eventos transgénicos a partir de cotiledones.

Por otro lado, la inducción de embriones y órganos a partir de células somáticas transformadas con *Agrobacterium* (líneas 203, M12 y ST4), ilustra cómo el ambiente de selección, en combinación con la integración y expresión estable de los complejos dCas9-VP64 y dCas9-ATX1-SET, puede favorecer distintas respuestas morfogénicas *in vitro*. Sin embargo, todavía es necesario evaluar si la expresión del gen *PR-1* inducida por CRISPRa, especialmente mediante el sistema dCas9-ATX1-SET, influyó en las diferentes rutas morfogénicas observadas en los tratamientos M12 y ST4 (Figura 10). Recientemente, en un estudio similar al presente, Valencia-Lozano et al. (2024), demostraron que la edición epigenética del gen *WRKY29* en el cultivo de tomate, vía CRISPRa, mejoró la formación y germinación de embriones somáticos en presencia de citocininas y estrés osmótico. De acuerdo con estos autores, el establecimiento sintético de la marca epigenética H3K4me3 sobre la región promotora de *WRKY29* a través de la fusión de proteínas Cas inactivas (dCas9 y dCas12) con el dominio SET de *ATX1*, estableció un estado permisivo en la cromatina que promovió su transcripción (Valencia-Lozano et al. 2024). Este aumento en la expresión de *WRKY29* en combinación con las condiciones *in vitro* (transformación genética, medio de cultivo, estrés osmótico, fitohormonas, etc.) determinaron la formación de embriones somáticos (Valencia-Lozano et al. 2024). Este hallazgo es crucial para entender cómo se pueden manipular las condiciones culturales y moleculares para favorecer uno u otro tipo de desarrollo morfogénico *in vitro*. Puesto que hay indicios que apuntan a posibles funciones del gen *PR-1* en el desarrollo además de la defensa (Breen et al. 2017), cabe la posibilidad de que su sobreexpresión en los tejidos transformados haya influenciado los distintos fenotipos observados (Figura 9).

En general, después de cinco meses se generó un conjunto de plantas transgénicas (203, M12 y ST4) y controles (WT y C-) en condiciones de suelo. Análisis posteriores mediante la prueba de PCR confirmaron la integración de los vectores binarios en el ADN genómico de las plantas de tomate (consultar en García-Murillo et al. 2023). No obstante, si bien se produjeron plantas transgénicas en un periodo comparable al de otros trabajos, es necesario realizar estudios adicionales que permitan calcular la eficiencia de transformación de la presente metodología con respecto a otros protocolos publicados para el tomate, así como determinar la frecuencia con la que se obtienen estructuras organogénicas o embrionarias a partir de explantes que han sido transformados genéticamente y si la activación de *PR-1*, vía CRISPRa, influye en estos procesos.

En síntesis, la selección *in vitro* de órganos y embriones somáticos, así como la caracterización molecular de las plantas regeneradas, constatan la eficacia del sistema de transformación genética mediada por *Agrobacterium* para integrar y expresar los vectores CRISPRa en plantas transgénicas de tomate Micro-Tom obtenidas a partir de la transformación estable de hipocótilos.

## XI. Conclusiones y Recomendaciones

En el presente estudio hemos utilizado a la bacteria *A. tumefaciens* para generar plantas editadas de tomate por medio del sistema CRISPRa. Los resultados obtenidos subrayan la relevancia tanto del tipo de explante utilizado como de las condiciones de cultivo *in vitro* para lograr una transformación y regeneración exitosa, evidenciando una mayor eficacia en la transformación estable de hipocótilos con respecto a los cotiledones. Además, la inducción de órganos y embriones somáticos *in vitro* sugiere un potencial para manipular las condiciones culturales y transcripcionales con el fin de favorecer la respuesta morfogénica de interés en los tejidos transformados. Sin embargo, aún queda por analizar cómo los distintos vectores CRISPRa, M12 y ST4, alteran la expresión de *PR-1* *in planta* e *in vitro*.

En general, este trabajo constituye un avance en la producción de plantas de importancia agrícola editadas mediante el uso de CRISPRa. Los esfuerzos para transformar al tomate Micro-Tom, tanto de manera transitoria como constitutiva, son significativos, ya que las plantas generadas permitirán investigar las aplicaciones potenciales del sistema CRISPRa en la regulación transcripcional y epigenética del gen *PR-1* en diferentes contextos, tales como la interacción planta-patógeno y planta-microbio en el cultivo del tomate, por mencionar algunos. Otras recomendaciones experimentales y perspectivas se detallan a continuación:

En general, se espera que el posicionamiento sintético de la marca epigenética H3K4me3 sobre la región promotora de *PR-1* vía CRISPRa (dCas9-ATX1-SET) reduzca el daño causado por fitopatógenos como resultado de una respuesta inmunitaria rápida, robusta y eficiente (manifestado como un aumento en los niveles de expresión de *PR-1* en tiempo y espacio), misma que podría ser potencializada en combinación con el *priming* para proporcionar un mecanismo de defensa de amplio espectro e incluso tolerancia a condiciones de estrés abiótico (p. ej., estrés hídrico). Esto

último dependiendo del tipo de activador del *priming* utilizado (p. ej., análogos del ácido salicílico, bacterias promotoras del crecimiento, nanopartículas de sílice o titanio), así como el momento en el que este sea inducido (p. ej., en semillas, plántulas juveniles o adultas).

En lo que respecta a la interacción planta-microbio, además, se especula que la expresión basal de *PR-1* podría llegar a ser estimulada, en cierto modo, de manera selectiva, ya sea para inhibir las infecciones causadas por patógenos o para permitir la colonización de bacterias u hongos simbióticos, es decir, sin alterar las complejas relaciones mutualistas entre plantas y microorganismos benéficos, así como la habilidad de estos últimos para mediar la resistencia al estrés en sus hospederos (también conocido como resistencia sistémica inducida o ISR, por sus siglas en inglés).

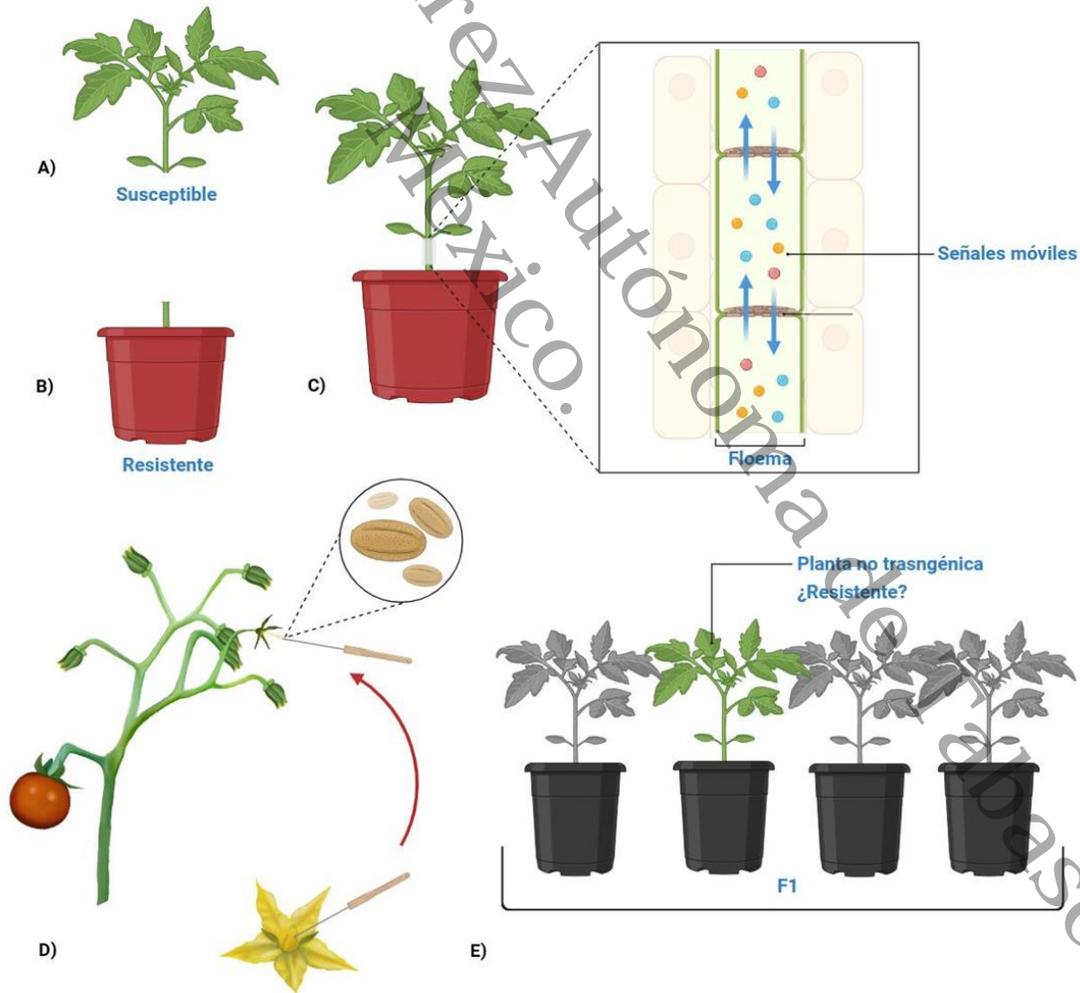
Finalmente, aunque el desarrollo de estas plantas permitirá llevar a cabo estudios *in vivo* acerca de, por ejemplo, el costo energético de la activación transcripcional de genes de defensa en características agronómicas como el rendimiento y la calidad de los frutos, especialmente en situaciones de estrés biótico, es importante tener en cuenta que la inducción de las alteraciones epigenéticas y/o transcripcionales deseadas es metodológicamente dependiente de la síntesis continua de los componentes moleculares del sistema CRISPRa en la célula vegetal, al menos en la generación parental. En la actualidad, por consiguiente, la generación de plantas editadas epigenéticamente se logra a través de plantas transgénicas, lo que a su vez restringe el uso generalizado de esta tecnología en la agricultura, principalmente a causa de la incapacidad para transformar y regenerar a la gran mayoría de las plantas cultivables *in vitro* (Altpeter et al. 2016), así como por las regulaciones impuestas a los organismos genéticamente modificados (OGM). No obstante, en el futuro esto podría ser solucionado mediante estrategias de integración, ampliación y expresión transitorias basadas en una nueva generación de vectores virales de ARN capaces de

transfectar grandes complejos proteicos sin la necesidad de realizar cambios en el ADN (Khakhar y Voytas, 2021). Por consiguiente, con el fin de superar el dilema de las plantas editadas epigenéticamente e incorporar a la edición epigenómica en la protección y el mejoramiento de cultivos, es imperativo desarrollar nuevos protocolos y herramientas de transformación transitoria, así como sistemas de regulación epigenética más sofisticados, que nos permitan (re)programar el estado epigenético de las plantas, antes o durante una situación estresante, tanto en el laboratorio como en las áreas agrícolas, sin la necesidad de generar líneas transgénicas desde la generación parental. A corto plazo, en cambio, algunos métodos convencionales de fitomejoramiento como la autofecundación o la polinización cruzada, así como técnicas de propagación vegetativa a partir del uso de portainjertos provenientes de plantas editadas, son dos estrategias que podrían proveer una solución práctica a la presencia de ADN exógeno en las líneas editadas epigenéticamente (consultar a Katie et al. 2023; Springer y Schmitz, 2017; Viridi et al. 2015; Yang et al. 2015), por ejemplo, al permitir segregar los transgenes indeseados en la progenie sin alterar el estado epigenético previamente inducido o al proporcionar resistencia y protección al tejido injertado, ya sea mediante la acumulación y/o señalización de hormonas y proteínas defensivas o a través de factores epigenéticos móviles transmitidos desde el portainjerto hacia las partes no transformadas (“*graft transmissible*”), respectivamente (Figura 11).

Adicionalmente, las siguientes preguntas pueden guiar el desarrollo de próximas investigaciones:

1. ¿Las plantas editadas vía CRISPRa para regulación de *PR-1* exhibirán mayor resistencia a patógenos respecto a plantas control? En caso afirmativo, ¿puede este estado inmunológico ser transmitido a la progenie en ausencia del sistema CRISPRa?
2. ¿Cuáles son los costos (p. ej., energéticos y ecológicos) asociados a la activación inducible/constitutiva de *PR-1* vía CRISPRa?

3. ¿Cómo la reconfiguración del estado transcripcional y epigenético de *PR-1* influye en el microbioma?
4. ¿Pueden las plantas editadas beneficiarse del *priming* y de los efectos benéficos inherentes de algunos elicitores para adquirir una protección más amplia contra patógenos?
5. ¿Es el uso de portainjertos provenientes de plantas editadas una estrategia viable para aliviar el estrés causado por las enfermedades transmitidas por el suelo e inducir resistencia en el tejido injertado?
6. ¿Pueden las marcas epigenéticas inducidas por el complejo dCas9-ATX1-SET ser transmitidas a la progenie en ausencia del sistema CRISPRa? De ser el caso, ¿Los epialelos inducidos mostrarán una herencia Mendeliana?



**Figura 11. Proceso de injertado y segregación de transgenes a partir de plantas editadas vía CRISPRa.** El injertado es un proceso por medio del cual se combinan las características hortícolas deseables de dos variedades en un nuevo individuo sin la necesidad de emplear técnicas de mejoramiento genético. El uso de injertos provenientes de variedades no transgénicas altamente productivas o con propiedades nutricionales de interés, pero susceptibles a enfermedades radiculares o vasculares causadas por patógenos presentes en suelos, podrían beneficiarse de portainjertos provenientes de plantas que han sido editadas para ser más resistentes a las infecciones de patógenos, adquiriendo inmunidad incluso en los tejidos distantes (injertados) por medio de señales móviles. A diferencia del uso de portainjertos, la autofecundación o la polinización cruzada son procesos imprescindibles en el mejoramiento convencional de cultivos. En plantas cuyos genomas y epigenomas han sido editados (p. ej., a través de nucleasas programables y epi-efectores, respectivamente), además, estas técnicas nos permiten segregar las secuencias de ADN viral o bacteriano —inherentes a los métodos de transformación genética de plantas más adoptados— y conservar las ediciones genéticas o epigenéticas efectuadas en un porcentaje de la progenie. A) Esqueje proveniente de una variedad productiva, pero susceptible a enfermedades; B) portainjerto/patrón proveniente de una planta editada para ser resistente a patógenos, pero poco productiva; C) planta injertada resistente y productiva; D) autofecundación o polinización cruzada; E) segregación de transgenes. Figura elaborada en BioRender.com con ilustraciones amablemente diseñadas por la ilustradora Isaura Centurión de la Cruz (flores e inflorescencias del tomate).

## XII. Referencias citadas

- Adli, M. (2018). The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nature Communications*, 9(1), 1911. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04252-2>
- Agarwal, G., Kudapa, H., Ramalingam, A., Choudhary, D., Sinha, P., Garg, V., . . . Varshney, R. K. (2020). Epigenetics and epigenomics: underlying mechanisms, relevance, and implications in crop improvement. *Functional y Integrative Genomics*, 20(6), 739-761. <https://doi.org/10.1007/s10142-020-00756-7>
- Alexandratos, N., y Bruinsma, J. (2012). *World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision*. [World Agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision \(fao.org\)](http://www.fao.org/world-agriculture-towards-2030-2050-the-2012-revision)
- Alonso, C., Ramos-Cruz, D., y Becker, C. (2019). The role of plant epigenetics in biotic interactions. *New Phytologist*, 221(2), 731-737. <https://doi.org/10.1111/nph.15408>
- Altpeter, F., Springer, N. M., Bartley, L. E., Blechl, A. E., Brutnell, T. P., Citovsky, V., . . . Stewart Jr, C. N. (2016). Advancing Crop Transformation in the Era of Genome Editing. *The Plant Cell*, 28(7), 1510-1520. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00196>
- Alvarez-Venegas, R., Abdallat, A. A., Guo, M., Alfano, J. R., y Avramova, Z. (2007). Epigenetic Control of a Transcription Factor at the Cross Section of Two Antagonistic Pathways. *Epigenetics*, 2(2), 106-113. <https://doi.org/10.4161/epi.2.2.4404>
- Alvarez-Venegas, R., y Avramova, Z. (2005). Methylation patterns of histone H3 Lys 4, Lys 9 and Lys 27 in transcriptionally active and inactive Arabidopsis genes and in *atx1* mutants. *Nucleic Acids Research*, 33(16), 5199-5207. <https://doi.org/10.1093/nar/gki830>
- Alvarez-Venegas, R., Pien, S., Sadder, M., Witmer, X., Grossniklaus, U., y Avramova, Z. (2003). *ATX-1*, an *Arabidopsis* Homolog of Trithorax, Activates Flower Homeotic Genes. *Current Biology*, 13(8), 627-637. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00243-4](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00243-4)

- Arie, T., Takahashi, H., Kodama, M., y Teraoka, T. (2007). Tomato as a model plant for plant-pathogen interactions. *Plant Biotechnology*, 24(1), 135-147. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.24.135>
- Avramova, Z. (2015). Transcriptional ‘memory’ of a stress: transient chromatin and memory (epigenetic) marks at stress-response genes. *The Plant Journal*, 83(1), 149-159. <https://doi.org/10.1111/tpj.12832>
- Bain, S. A. (2019). *Epigenetic mechanisms underlying paternal genome elimination*. [Doctoral dissertation, The University of Edinburgh]. <http://hdl.handle.net/1842/35675>
- Bhatia, P., Ashwath, N., Senaratna, T., y Midmore, D. (2004). Tissue Culture Studies of Tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 78(1), 1-21. <https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000020430.08558.6e>
- Bibikova, M., Beumer, K., Trautman, J. K., y Carroll, D. (2003). Enhancing Gene Targeting with Designed Zinc Finger Nucleases. *Science*, 300(5620), 764-764. <https://doi.org/10.1126/science.1079512>
- Breen, S., Williams, S. J., Outram, M., Kobe, B., y Solomon, P. S. (2017). Emerging Insights into the Functions of Pathogenesis-Related Protein 1. *Trends in Plant Science*, 22(10), 871-879. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.06.013>
- Cardoza, V. (2008). Tissue Culture: The Manipulation of Plant Development. In *Plant Biotechnology and Genetics* (pp. 113-134).
- Carroll, D. (2011). Genome Engineering with Zinc-Finger Nucleases. *Genetics*, 188(4), 773-782. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.131433>
- Carroll, D. (2014). Genome Engineering with Targetable Nucleases. *Annual Review of Biochemistry*, 83(1), 409-439. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035418>

- Carvalho, F. P. (2017). Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security*, 6(2), 48-60. <https://doi.org/10.1002/fes3.108>
- Chaloner, T. M., Gurr, S. J., y Bebbler, D. P. (2021). Plant pathogen infection risk tracks global crop yields under climate change. *Nature Climate Change*, 11(8), 710-715. <https://doi.org/10.1038/s41558-021-01104-8>
- Chen, K., Wang, Y., Zhang, R., Zhang, H., y Gao, C. (2019). CRISPR/Cas Genome Editing and Precision Plant Breeding in Agriculture. *Annual Review of Plant Biology*, 70(1), 667-697. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100049>
- Chen, M., y Qi, L. S. (2017). Repurposing CRISPR System for Transcriptional Activation. In L.-C. Li (Ed.), *RNA Activation* (pp. 147-157). Singapore: Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-4310-9\\_10](https://doi.org/10.1007/978-981-10-4310-9_10)
- Chen, Y. H., Gols, R., y Benrey, B. (2015). Crop Domestication and Its Impact on Naturally Selected Trophic Interactions. *Annual Review of Entomology*, 60(1), 35-58. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020601>
- Christian, M., Cermak, T., Doyle, E. L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., . . . Voytas, D. F. (2010). Targeting DNA Double-Strand Breaks with TAL Effector Nucleases. *Genetics*, 186(2), 757-761. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.120717>
- Chumpookam, J., Lin, H.-L., y Shiesh, C.-C. (2012). Effect of Smoke-water on Seed Germination and Seedling Growth of Papaya (*Carica papaya* cv. Tainung No. 2). *HortScience*, 47(6), 741-744. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.47.6.741>
- Chylinski, K., Makarova, K. S., Charpentier, E., y Koonin, E. V. (2014). Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research*, 42(10), 6091-6105. <https://doi.org/10.1093/nar/gku241>

- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., . . . Zhang, F. (2013). Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science*, 339(6121), 819-823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>
- Conrath, U., Beckers, G. J. M., Langenbach, C. J. G., y Jaskiewicz, M. R. (2015). Priming for Enhanced Defense. *Annual Review of Phytopathology*, 53(1), 97-119. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120132>
- de Melo, B. P., Lourenço-Tessutti, I. T., Paixão, J. F. R., Noriega, D. D., Silva, M. C. M., de Almeida-Engler, J., . . . Grossi-de-Sa, M. F. (2020). Transcriptional modulation of *AREB-1* by CRISPRa improves plant physiological performance under severe water deficit. *Scientific Reports*, 10(1), 16231. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72464-y>
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., . . . Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471(7340), 602-607. <https://doi.org/10.1038/nature09886>
- Deutsch, C. A., Tewksbury, J. J., Tigchelaar, M., Battisti, D. S., Merrill, S. C., Huey, R. B., y Naylor, R. L. (2018). Increase in crop losses to insect pests in a warming climate. *Science*, 361(6405), 916-919. <https://doi.org/10.1126/science.aat3466>
- Díaz-Valle, A., López-Calleja, A. C., y Alvarez-Venegas, R. (2019). Enhancement of Pathogen Resistance in Common Bean Plants by Inoculation with *Rhizobium etli*. *Frontiers in Plant Science*, 10, 465054. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01317>
- Ding, Y., Avramova, Z., y Fromm, M. (2011). Two Distinct Roles of *ARABIDOPSIS HOMOLOG OF TRITHORAX1* (*ATX1*) at Promoters and within Transcribed Regions of *ATX1*-Regulated Genes. *The Plant Cell*, 23(1), 350-363. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.080150>

- Ding, Y., Ndamukong, I., Xu, Z., Lapko, H., Fromm, M., y Avramova, Z. (2012). *ATX1*-Generated H3K4me3 Is Required for Efficient Elongation of Transcription, Not Initiation, at *ATX1*-Regulated Genes. *PLOS Genetics*, 8(12), e1003111. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003111>
- Doudna, J. A., y Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- El-Shetehy, M., Moradi, A., Maceroni, M., Reinhardt, D., Petri-Fink, A., Rothen-Rutishauser, B., . . . Schwab, F. (2021). Silica nanoparticles enhance disease resistance in *Arabidopsis* plants. *Nature Nanotechnology*, 16(3), 344-353. <https://doi.org/10.1038/s41565-020-00812-0>
- Epstein, L. (2014). Fifty Years Since Silent Spring. *Annual Review of Phytopathology*, 52(1), 377-402. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045900>
- FAO. (2020). *World Food and Agriculture - Statistical Yearbook 2020*. Rome, Italy: FAO. <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/fe3b44ad-553a-4d2f-b8d9-d0ef1dc509ed/content>
- Fehér, A. (2019). Callus, Dedifferentiation, Totipotency, Somatic Embryogenesis: What These Terms Mean in the Era of Molecular Plant Biology?. *Frontiers in plant science*, 10, 442509. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536>
- Feng, Z., Zhang, B., Ding, W., Liu, X., Yang, D.-L., Wei, P., . . . Zhu, J.-K. (2013). Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Research*, 23(10), 1229-1232. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.114>

- Fernie, A. R., y Yan, J. (2019). De Novo Domestication: An Alternative Route toward New Crops for the Future. *Molecular Plant*, 12(5), 615-631. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.03.016>
- Finer, J., y Dhillon, T. (2008). Transgenic Plant Production. *Plant Biotechnology and Genetics: Principles, Techniques, and Applications*, 245-274. <https://doi.org/10.1002/9780470282014.ch10>
- Fromm, M., y Avramova, Z. (2014). ATX1/AtCOMPASS and the H3K4me3 marks: how do they activate *Arabidopsis* genes? *Current Opinion in Plant Biology*, 21, 75-82. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.07.004>
- Gallego-Bartolomé, J., Gardiner, J., Liu, W., Papikian, A., Ghoshal, B., Kuo, H. Y., . . . Jacobsen, S. E. (2018). Targeted DNA demethylation of the *Arabidopsis* genome using the human TET1 catalytic domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(9), E2125-E2134. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716945115>
- Gao, C. (2021). Genome engineering for crop improvement and future agriculture. *Cell*, 184(6), 1621-1635. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.005>
- García-Murillo, L., Valencia-Lozano, E., Priego-Ranero, N. A., Cabrera-Ponce, J. L., Duarte-Aké, F. P., Vizuet-de-Rueda, J. C., . . . Alvarez-Venegas, R. (2023). CRISPRa-mediated transcriptional activation of the *SIPR-1* gene in edited tomato plants. *Plant Science*, 329, 111617. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2023.111617>
- Gardiner, J., Ghoshal, B., Wang, M., y Jacobsen, S. E. (2022). CRISPR-Cas-mediated transcriptional control and epi-mutagenesis. *Plant Physiology*, 188(4), 1811-1824. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac033>

- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., y Siksnys, V. (2012). Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(39), E2579-E2586. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208507109>
- Ghogare, R., Ludwig, Y., Bueno, G. M., Slamet-Loedin, I. H., y Dhingra, A. (2021). Genome editing reagent delivery in plants. *Transgenic Research*, 30(4), 321-335. <https://doi.org/10.1007/s11248-021-00239-w>
- Gilbert, Luke A., Horlbeck, Max A., Adamson, B., Villalta, Jacqueline E., Chen, Y., Whitehead, Evan H., . . . Weissman, Jonathan S. (2014). Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. *Cell*, 159(3), 647-661. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.029>
- Gilbert, Luke A., Larson, Matthew H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, Gloria A., Torres, Sandra E., . . . Qi, Lei S. (2013). CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes. *Cell*, 154(2), 442-451. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.044>
- Godfray, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., . . . Toulmin, C. (2010). Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. *Science*, 327(5967), 812-818. <https://doi.org/10.1126/science.1185383>
- Gohari, G., Jiang, M., Manganaris, G. A., Zhou, J., y Fotopoulos, V. (2024). Next generation chemical *priming*: with a little help from our nanocarrier friends. *Trends in Plant Science*, 29(2), 150-166. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2023.11.024>
- Goldman, A. D., y Landweber, L. F. (2016). What Is a Genome? *PLOS Genetics*, 12(7), e1006181. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006181>

- Gratz, S. J., Cummings, A. M., Nguyen, J. N., Hamm, D. C., Donohue, L. K., Harrison, M. M., . . . O'Connor-Giles, K. M. (2013). Genome Engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-Guided Cas9 Nuclease. *Genetics*, *194*(4), 1029-1035. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.152710>
- Harris, C. J., Amtmann, A., y Ton, J. (2023). Epigenetic processes in plant stress *priming*: Open questions and new approaches. *Current Opinion in Plant Biology*, *75*, 102432. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2023.102432>
- Hefferin, M. L., y Tomkinson, A. E. (2005). Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair*, *4*(6), 639-648. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.12.005>
- Hille, F., y Charpentier, E. (2016). CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *371*(1707), 20150496. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0496>
- Hille, F., Richter, H., Wong, S. P., Bratovič, M., Ressel, S., y Charpentier, E. (2018). The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. *Cell*, *172*(6), 1239-1259. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.032>
- Hilton, I. B., D'Ippolito, A. M., Vockley, C. M., Thakore, P. I., Crawford, G. E., Reddy, T. E., y Gersbach, C. A. (2015). Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nature Biotechnology*, *33*(5), 510-517. <https://doi.org/10.1038/nbt.3199>
- Hirai, H., Tani, T., y Kikyo, N. (2010). Structure and functions of powerful transactivators: VP16, MyoD and FoxA. *The International journal of developmental biology*, *54*(11-12), 1589. <https://doi.org/10.1387/ijdb.103194hh>

- Holme, I. B., Wendt, T., y Holm, P. B. (2013). Intragenesis and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development. *Plant Biotechnology Journal*, 11(4), 395-407. <https://doi.org/10.1111/pbi.12055>
- Hsu, Patrick D., Lander, Eric S., y Zhang, F. (2014). Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell*, 157(6), 1262-1278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>
- Hwang, W. Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M. L., Tsai, S. Q., Sander, J. D., . . . Joung, J. K. (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, 31(3), 227-229. <https://doi.org/10.1038/nbt.2501>
- Jain, D., y Khurana, J. P. (2018). Role of Pathogenesis-Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism. In A. Singh y I. K. Singh (Eds.), *Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction* (pp. 265-281). Singapore: Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-7371-7\\_12](https://doi.org/10.1007/978-981-10-7371-7_12)
- Jiang, F., y Doudna, J. A. (2017). CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms. *Annual Review of Biophysics*, 46(1), 505-529. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-010822>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., y Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, 337(6096), 816-821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Jung, H. W., Tschaplinski, T. J., Wang, L., Glazebrook, J., y Greenberg, J. T. (2009). Priming in Systemic Plant Immunity. *Science*, 324(5923), 89-91. <https://doi.org/10.1126/science.1170025>

- Kakoulidou, I., Avramidou, E. V., Baránek, M., Brunel-Muguet, S., Farrona, S., Johannes, F., . . . Maury, S. (2021). Epigenetics for Crop Improvement in Times of Global Change. *Biology*, *10*(8). <https://doi.org/10.3390/biology10080766>
- Kang, H., Fan, T., Wu, J., Zhu, Y., y Shen, W.-H. (2022). Histone modification and chromatin remodeling in plant response to pathogens. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 986940. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.986940>
- Karlson, C. K., Mohd-Noor, S. N., Nolte, N., y Tan, B. C. (2021). CRISPR/dCas9-Based Systems: Mechanisms and Applications in Plant Sciences. *Plants*, *10*(10). <https://doi.org/10.3390/plants10102055>
- Katie, S., Michael, R. R., Katie, J.-C., Marco, C., y Estrella, L. (2023). Developmentally regulated generation of a systemic signal for long-lasting defence *priming* in tomato. *bioRxiv*, 2023.2010.2009.561512. <https://doi.org/10.1101/2023.10.09.561512>
- Khakhar, A., y Voytas, D. F. (2021). RNA Viral Vectors for Accelerating Plant Synthetic Biology. *Frontiers in plant science*, *12*, 668580. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.668580>
- Khush, G. S. (2001). Green revolution: the way forward. *Nature Reviews Genetics*, *2*(10), 815-822. <https://doi.org/10.1038/35093585>
- Kim, H., y Kim, J.-S. (2014). A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nature Reviews Genetics*, *15*(5), 321-334. <https://doi.org/10.1038/nrg3686>
- Köhler, H.-R., y Triebkorn, R. (2013). Wildlife Ecotoxicology of Pesticides: Can We Track Effects to the Population Level and Beyond? *Science*, *341*(6147), 759-765. <https://doi.org/10.1126/science.1237591>
- Krenek, P., Samajova, O., Luptovciak, I., Duskocilova, A., Komis, G., y Samaj, J. (2015). Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles,

- methods and applications. *Biotechnology Advances*, 33(6, Part 2), 1024-1042. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.012>
- Kungulovski, G., y Jeltsch, A. (2016). Epigenome Editing: State of the Art, Concepts, and Perspectives. *Trends in Genetics*, 32(2), 101-113. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.12.001>
- Lacroix, B., y Citovsky, V. (2013). The roles of bacterial and host plant factors in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *The International journal of developmental biology*, 57(6-7-8), 467-481. <https://doi.org/10.1387/ijdb.130199bl>
- Langner, T., Kamoun, S., y Belhaj, K. (2018). CRISPR Crops: Plant Genome Editing Toward Disease Resistance. *Annual review of phytopathology*, 56, 479-512. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-050158>
- Lau, C.-H., y Suh, Y. (2018). *In vivo* epigenome editing and transcriptional modulation using CRISPR technology. *Transgenic Research*, 27(6), 489-509. <https://doi.org/10.1007/s11248-018-0096-8>
- Lee-Yoon, L., Shun-Kai, Y., De-Xian Andrew, K., Janna Ong, A., Ngai-Paing, T., y Kok-Song, L. (2018). Transgenic Plants: Gene Constructs, Vector and Transformation Method. In Ç. Özge (Ed.), *New Visions in Plant Science* (pp. Ch. 3). <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.79369>
- Lee, J.-S., Smith, E., y Shilatifard, A. (2010). The Language of Histone Crosstalk. *Cell*, 142(5), 682-685. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.08.011>
- Lee, M. H., Lee, J., Jie, E. Y., Choi, S. H., Jiang, L., Ahn, W. S., . . . Kim, S. W. (2020). Temporal and Spatial Expression Analysis of Shoot-Regeneration Regulatory Genes during the Adventitious Shoot Formation in Hypocotyl and Cotyledon Explants of Tomato (CV.

- Micro-Tom). *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15).  
<https://doi.org/10.3390/ijms21155309>
- Lieber, M. R. (2010). The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway. *Annual Review of Biochemistry*, 79(1), 181-211. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.093131>
- Liu, C., Lu, F., Cui, X., y Cao, X. (2010). Histone Methylation in Higher Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1), 395-420. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.091939>
- Liu, H., Brettell, L. E., Qiu, Z., y Singh, B. K. (2020). Microbiome-Mediated Stress Resistance in Plants. *Trends in Plant Science*, 25(8), 733-743.  
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.03.014>
- Liu, W., y Stewart, C. N. (2016). Plant synthetic promoters and transcription factors. *Current Opinion in Biotechnology*, 37, 36-44. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.10.001>
- Lockwood, J. R. (2010). The fate of the Rocky Mountain locust, *Melanoplus spretus* Walsh: implications for conservation biology. *Terrestrial Arthropod Reviews*, 3(2), 129-160.  
<https://doi.org/10.1163/187498310X523874>
- López-Calleja, A. C., Vizuet-de-Rueda, J. C., y Alvarez-Venegas, R. (2019). Targeted Epigenome Editing of Plant Defense Genes via CRISPR Activation (CRISPRa). In R. Alvarez-Venegas, C. De-la-Peña, y J. A. Casas-Mollano (Eds.), *Epigenetics in Plants of Agronomic Importance: Fundamentals and Applications: Transcriptional Regulation and Chromatin Remodelling in Plants* (pp. 267-289). Cham: Springer International Publishing.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-030-14760-0\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-030-14760-0_10)
- López-Calleja, A. C., Vizuet-de-Rueda, J. C., y Alvarez-Venegas, R. (2021). Chapter 5 - CRISPR-Cas epigenome editing: improving crop resistance to pathogens. In K. A. Abd-Elsalam y

- K.-T. Lim (Eds.), *CRISPR and RNAi Systems* (pp. 65-106): Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821910-2.00030-8>
- López, C. E., y Bernal, A. J. (2012). Cassava Bacterial Blight: Using Genomics for the Elucidation and Management of an Old Problem. *Tropical Plant Biology*, 5(1), 117-126.  
<https://doi.org/10.1007/s12042-011-9092->
- Lowder, L. G., Paul, J. W., y Qi, Y. (2017). Multiplexed Transcriptional Activation or Repression in Plants Using CRISPR-dCas9-Based Systems. In K. Kaufmann y B. Mueller-Roeber (Eds.), *Plant Gene Regulatory Networks: Methods and Protocols* (pp. 167-184). New York, NY: Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7125-1\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7125-1_12)
- Lowder, L. G., Zhang, D., Baltus, N. J., Paul, J. W., III, Tang, X., Zheng, X., . . . Qi, Y. (2015). A CRISPR/Cas9 Toolbox for Multiplexed Plant Genome Editing and Transcriptional Regulation. *Plant Physiology*, 169(2), 971-985. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00636>
- Maeder, M. L., Linder, S. J., Cascio, V. M., Fu, Y., Ho, Q. H., y Joung, J. K. (2013). CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nature Methods*, 10(10), 977-979.  
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2598>
- Martí, E., Gisbert, C., Bishop, G. J., Dixon, M. S., y García-Martínez, J. L. (2006). Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. *Journal of Experimental Botany*, 57(9), 2037-2047. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj154>
- Martínez-Aguilar, K., Hernández-Chávez, J. L., y Alvarez-Venegas, R. (2021). Priming of seeds with INA and its transgenerational effect in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants. *Plant Science*, 305, 110834. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2021.110834>

- Mauch-Mani, B., Baccelli, I., Luna, E., y Flors, V. (2017). Defense *Priming*: An Adaptive Part of Induced Resistance. *Annual Review of Plant Biology*, 68(1), 485-512. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-041132>
- McCook, S., y Vandermeer, J. (2015). The Big Rust and the Red Queen: Long-Term Perspectives on Coffee Rust Research. *Phytopathology*, 105(9), 1164-1173. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-15-0085-RVW>
- Melander, A. L. (1914). Can Insects Become Resistant to Sprays? *Journal of Economic Entomology*, 7(2), 167-173. <https://doi.org/10.1093/jee/7.2.167>
- Milla, R., Osborne, C. P., Turcotte, M. M., y Violle, C. (2015). Plant domestication through an ecological lens. *Trends in Ecology y Evolution*, 30(8), 463-469. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2015.06.006>
- Miller, H. I., y Morandini, P. A. (2018). Plant Domestication, the Brave Old World of Genetic Modification. In M. Kuntz (Ed.), *Advances in Botanical Research* (Vol. 86, pp. 1-15): Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2017.11.001>
- Mojica, F. J. M., y Montoliu, L. (2016). On the Origin of CRISPR-Cas Technology: From Prokaryotes to Mammals. *Trends in Microbiology*, 24(10), 811-820. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.06.005>
- Moradpour, M., y Abdulah, S. N. A. (2020). CRISPR/dCas9 platforms in plants: strategies and applications beyond genome editing. *Plant Biotechnology Journal*, 18(1), 32-44. <https://doi.org/10.1111/pbi.13232>
- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio-Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

- Nakamura, M., Gao, Y., Dominguez, A. A., y Qi, L. S. (2021). CRISPR technologies for precise epigenome editing. *Nature Cell Biology*, 23(1), 11-22. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-00620-7>
- Newsom, S., Parameshwaran, H. P., Martin, L., y Rajan, R. (2021). The CRISPR-Cas mechanism for adaptive immunity and alternate bacterial functions fuels diverse biotechnologies. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 619763. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.619763>
- Nicolas Ventura, B. 2024. Análisis de la expresión del gen *PR1* en plantas de jitomate editadas epigenéticamente mediante CRISPR/dCas9, en combinación con el uso de acibenzolar s-methyl, en respuesta a patógenos. [Tesis de Maestría sin publicar]. CINVESTAV, Unidad Irapuato.
- Padmanabhan, S. Y. (1973). The Great Bengal Famine. *Annual Review of Phytopathology*, 11(1), 11-24. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.11.090173.000303>
- Pan, C., Sretenovic, S., y Qi, Y. (2021). CRISPR/dCas-mediated transcriptional and epigenetic regulation in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 60, 101980. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.101980>
- Papikian, A., Liu, W., Gallego-Bartolomé, J., y Jacobsen, S. E. (2019). Site-specific manipulation of *Arabidopsis* loci using CRISPR-Cas9 SunTag systems. *Nature Communications*, 10(1), 729. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08736-7>
- Pei, D., Beier, D. W., Levy-Lahad, E., Marchant, G., Rossant, J., Izpisua Belmonte, J. C., . . . Baltimore, D. (2017). Human Embryo Editing: Opportunities and Importance of Transnational Cooperation. *Cell Stem Cell*, 21(4), 423-426. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.09.010>

- Perez-Pinera, P., Kocak, D. D., Vockley, C. M., Adler, A. F., Kabadi, A. M., Polstein, L. R., . . . Gersbach, C. A. (2013). RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nature Methods*, *10*(10), 973-976. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2600>
- Piatek, A., Ali, Z., Baazim, H., Li, L., Abulfaraj, A., Al-Shareef, S., . . . Mahfouz, M. M. (2015). RNA-guided transcriptional regulation in planta via synthetic dCas9-based transcription factors. *Plant Biotechnology Journal*, *13*(4), 578-589. <https://doi.org/10.1111/pbi.12284>
- Pien, S. p., Fleury, D., Mylne, J. S., Crevillen, P., Inzé, D., Avramova, Z., . . . Grossniklaus, U. (2008). *ARABIDOPSIS TRITHORAX1* Dynamically Regulates *FLOWERING LOCUS C* Activation via Histone 3 Lysine 4 Trimethylation. *The Plant Cell*, *20*(3), 580-588. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.058172>
- Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C. M., y Bakker, P. A. H. M. (2014). Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Annual Review of Phytopathology*, *52*(1), 347-375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
- Ploetz, R. C. (2000). Panama Disease: A Classic and Destructive Disease of Banana. *Plant Health Progress*, *1*(1), 10. <https://doi.org/10.1094/PHP-2000-1204-01-HM>
- Ploetz, R. C. (2015). Fusarium Wilt of Banana. *Phytopathology*®, *105*(12), 1512-1521. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-15-0101-RVW>
- Puchta, H., Dujon, B., y Hohn, B. (1993). Homologous recombination in plant cells is enhanced by *in vivo* induction of double strand breaks into DNA by a site-specific endonuclease. *Nucleic Acids Research*, *21*(22), 5034-5040. <https://doi.org/10.1093/nar/21.22.5034>

- Purugganan, M. D., y Fuller, D. Q. (2009). The nature of selection during plant domestication. *Nature*, 457(7231), 843-848. <https://doi.org/10.1038/nature07895>
- Qi, Lei S., Larson, Matthew H., Gilbert, Luke A., Doudna, Jennifer A., Weissman, Jonathan S., Arkin, Adam P., y Lim, Wendell A. (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. *Cell*, 152(5), 1173-1183. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.022>
- Ramírez-Carrasco, G., Martínez-Aguilar, K., y Alvarez-Venegas, R. (2017). Transgenerational Defense Priming for Crop Protection against Plant Pathogens: A Hypothesis. *Frontiers in plant science*, 8, 263863. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00696>
- Ran, Y., Liang, Z., y Gao, C. (2017). Current and future editing reagent delivery systems for plant genome editing. *Science China Life Sciences*, 60(5), 490-505. <https://doi.org/10.1007/s11427-017-9022-1>
- Rath, D., Amlinger, L., Rath, A., y Lundgren, M. (2015). The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms, and applications. *Biochimie*, 117, 119-128. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.03.025>
- Rato, C., Carvalho, M. F., Azevedo, C., y Oblessuc, P. R. (2021). Genome editing for resistance against plant pests and pathogens. *Transgenic Research*, 30(4), 427-459. <https://doi.org/10.1007/s11248-021-00262-x>
- Reardon, S. (2019). CRISPR gene-editing creates wave of exotic model organisms. *Nature*, 568(7752), 441-443. <https://doi.org/10.1038/d41586-019-01300-9>
- Robb, G. B. (2019). Genome Editing with CRISPR-Cas: An Overview. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 19(1), e36. <https://doi.org/10.1002/cpet.36>

- Roca Paixão, J. F., Gillet, F.-X., Ribeiro, T. P., Bournaud, C., Lourenço-Tessutti, I. T., Noriega, D. D., . . . Grossi-de-Sa, M. F. (2019). Improved drought stress tolerance in *Arabidopsis* by CRISPR/dCas9 fusion with a Histone Acetyltransferase. *Scientific Reports*, 9(1), 8080. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44571-y>
- Rouet, P., Smih, F., y Jasin, M. (1994). Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Molecular and Cellular Biology*, 14(12), 8096-8106. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.12.8096-8106.1994>
- Saito, T., Ariizumi, T., Okabe, Y., Asamizu, E., Hiwasa-Tanase, K., Fukuda, N., . . . Ezura, H. (2011). TOMATOMA: A Novel Tomato Mutant Database Distributing Micro-Tom Mutant Collections. *Plant and Cell Physiology*, 52(2), 283-296. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr004>
- Sajwan, S., y Mannervik, M. (2019). Gene activation by dCas9-CBP and the SAM system differ in target preference. *Scientific Reports*, 9(1), 18104. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54179-x>
- Saleh, A., Al-Abdallat, A., Ndamukong, I., Alvarez-Venegas, R., y Avramova, Z. (2007). The *Arabidopsis* homologs of *trithorax* (*ATX1*) and enhancer of *zeste* (*CLF*) establish 'bivalent chromatin marks' at the silent *AGAMOUS* locus. *Nucleic Acids Research*, 35(18), 6290-6296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm464>
- Salsman, J., y Dellaire, G. (2016). Precision genome editing in the CRISPR era. *Biochemistry and Cell Biology*, 95(2), 187-201. <https://doi.org/10.1139/bcb-2016-0137>
- Sánchez-Bayo, F., y Wyckhuys, K. A. G. (2019). Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. *Biological Conservation*, 232, 8-27. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.01.020>

- Sander, J. D., y Joung, J. K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature Biotechnology*, 32(4), 347-355. <https://doi.org/10.1038/nbt.2842>
- Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S. J., Esker, P., McRoberts, N., y Nelson, A. (2019). The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology y Evolution*, 3(3), 430-439. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y>
- Selma, S., y Orzáez, D. (2021). Perspectives for epigenetic editing in crops. *Transgenic Research*, 30(4), 381-400. <https://doi.org/10.1007/s11248-021-00252-z>
- Shah, S. A., Erdmann, S., Mojica, F. J. M., y Garrett, R. A. (2013). Protospacer recognition motifs. *RNA Biology*, 10(5), 891-899. <https://doi.org/10.4161/rna.23764>
- Sharma, A., Shukla, A., Attri, K., Kumar, M., Kumar, P., Suttee, A., . . . Singla, N. (2020). Global trends in pesticides: A looming threat and viable alternatives. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 201, 110812. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110812>
- Shikata, M., y Ezura, H. (2016). Micro-Tom Tomato as an Alternative Plant Model System: Mutant Collection and Efficient Transformation. *Plant Signal Transduction: Methods and Protocols* (pp. 47-55). New York, NY: Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3115-6\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3115-6_5)
- Smith, R. F., Apple, J. L., y Bottrell, D. G. (1976). The Origins of Integrated Pest Management Concepts for Agricultural Crops. In J. L. Apple y R. F. Smith (Eds.), *Integrated Pest Management* (pp. 1-16). Boston, MA: Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-7269-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-7269-5_1)
- Sparks, T. C., y Lorschach, B. A. (2017). Perspectives on the agrochemical industry and agrochemical discovery. *Pest Management Science*, 73(4), 672-677. <https://doi.org/10.1002/ps.4457>

- Springer, N. M., y Schmitz, R. J. (2017). Exploiting induced and natural epigenetic variation for crop improvement. *Nature Reviews Genetics*, 18(9), 563-575. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.45>
- Sternberg, S. H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E. C., y Doudna, J. A. (2014). DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, 507(7490), 62-67. <https://doi.org/10.1038/nature13011>
- Stukenbrock, E. H., y McDonald, B. A. (2008). The Origins of Plant Pathogens in Agro-Ecosystems. *Annual Review of Phytopathology*, 46(1), 75-100. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.010708.154114>
- Thakore, P. I., Black, J. B., Hilton, I. B., y Gersbach, C. A. (2016). Editing the epigenome: technologies for programmable transcription and epigenetic modulation. *Nature Methods*, 13(2), 127-137. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3733>
- Tilman, D., Balzer, C., Hill, J., y Befort, B. L. (2011). Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(50), 20260-20264. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116437108>
- Urnov, F. D. (2018). Genome Editing B.C. (Before CRISPR): Lasting Lessons from the “Old Testament”. *The CRISPR Journal*, 1(1), 34-46. <https://doi.org/10.1089/crispr.2018.29007.fyu>
- Valencia-Lozano, E., Cabrera-Ponce, J. L., Barraza, A., López-Calleja, A. C., García-Vázquez, E., Rivera-Toro, D. M., . . . Alvarez-Venegas, R. (2024). Editing of *SIWRKY29* by CRISPR-activation promotes somatic embryogenesis in *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom. *PLOS ONE*, 19(4), e0301169. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0301169>

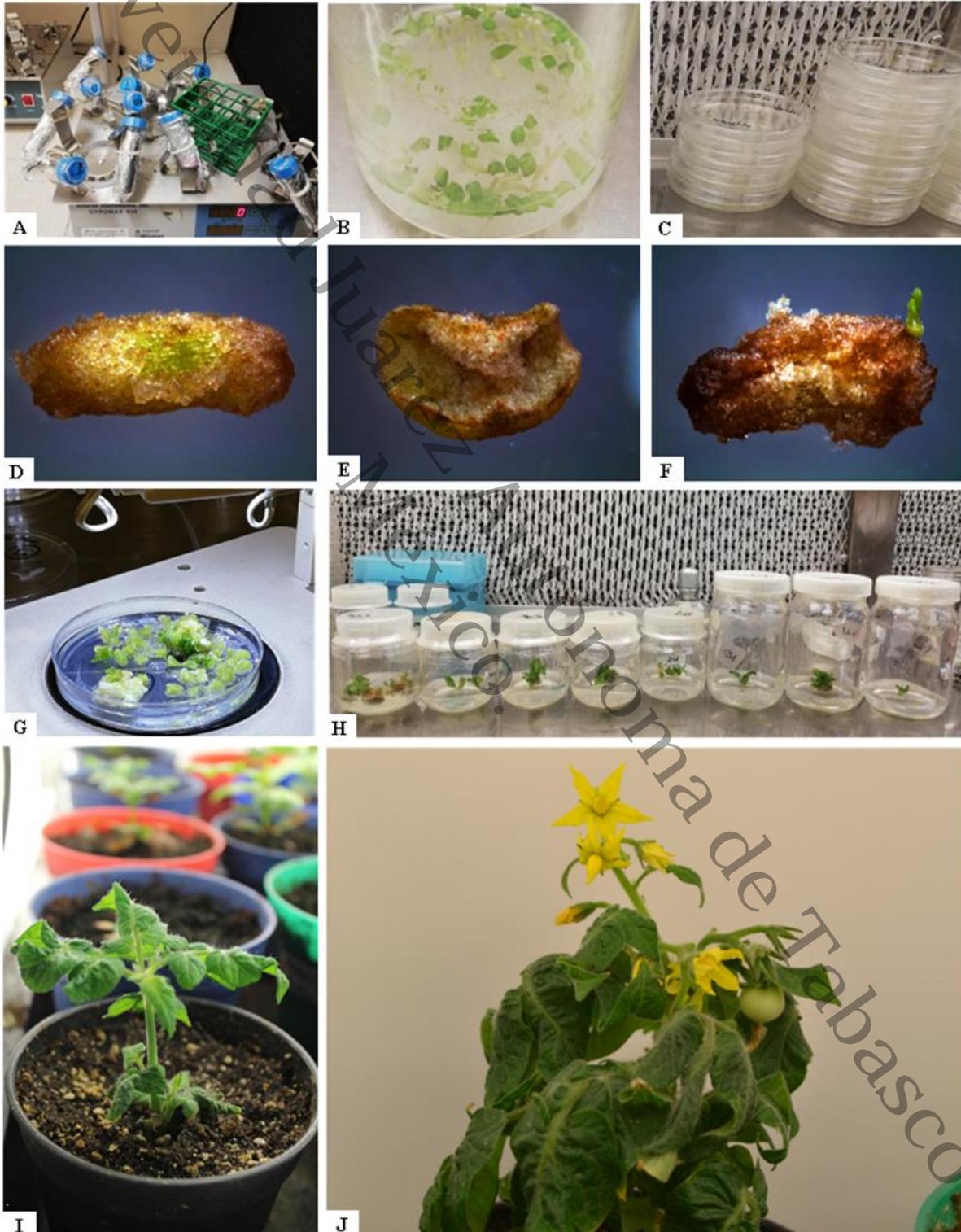
- van Dijk, M., Morley, T., Rau, M. L., y Saghai, Y. (2021). A meta-analysis of projected global food demand and population at risk of hunger for the period 2010–2050. *Nature Food*, 2(7), 494-501. <https://doi.org/10.1038/s43016-021-00322-9>
- Van Eck, J., Keen, P., y Tjahjadi, M. (2019). *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation of Tomato. In S. Kumar, P. Barone, y M. Smith (Eds.), *Transgenic Plants: Methods and Protocols* (pp. 225-234). New York, NY: Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8778-8\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8778-8_16)
- Van Esse, H. P., Reuber, T. L., y van der Does, D. (2020). Genetic modification to improve disease resistance in crops. *New Phytologist*, 225(1), 70-86. <https://doi.org/10.1111/nph.15967>
- Van Loon, L. C., Rep, M., y Pieterse, C. M. J. (2006). Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44(1), 135-162. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425>
- Veley, K. M., Elliott, K., Jensen, G., Zhong, Z., Feng, S., Yoder, M., . . . Bart, R. S. (2023). Improving cassava bacterial blight resistance by editing the epigenome. *Nature Communications*, 14(1), 85. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35675-7>
- Virdi, K. S., Laurie, J. D., Xu, Y.-Z., Yu, J., Shao, M.-R., Sanchez, R., . . . Mackenzie, S. A. (2015). Arabidopsis *MSH1* mutation alters the epigenome and produces heritable changes in plant growth. *Nature Communications*, 6(1), 6386. <https://doi.org/10.1038/ncomms7386>
- Wang, H., La Russa, M., y Qi, L. S. (2016). CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. *Annual Review of Biochemistry*, 85(1), 227-264. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014607>
- Wang, J. Y., y Doudna, J. A. (2023). CRISPR technology: A decade of genome editing is only the beginning. *Science*, 379(6629). <https://doi.org/10.1126/science.add8643>

- Weigel, D., y Glazebrook, J. (2006). Transformation of *agrobacterium* using electroporation. *CSH protocols*, 2006(7). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4665>
- Weinmann, M., Bradáčová, K., y Nikolic, M. (2023). Chapter 10 - Relationship between mineral nutrition, plant diseases, and pests. Elsevier Ltd. In Z. Rengel, I. Cakmak, y P. J. White (Eds.), *Marschner's Mineral Nutrition of Plants (Fourth Edition)* (pp. 445-476). San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00010-8>
- Wilkinson, S. W., Magerøy, M. H., López Sánchez, A., Smith, L. M., Furci, L., Cotton, T. E. A., . . . Ton, J. (2019). Surviving in a Hostile World: Plant Strategies to Resist Pests and Diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 57(1), 505-529. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718-095959>
- Wise, A. A., Liu, Z., y Binns, A. N. (2006). Culture and Maintenance of *Agrobacterium* Strains. In K. Wang (Ed.), *Agrobacterium Protocols* (pp. 3-14). Totowa, NJ: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59745-130-4:3>
- Wright, Addison V., Nuñez, James K., y Doudna, Jennifer A. (2016). Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature's Toolbox for Genome Engineering. *Cell*, 164(1), 29-44. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.035>
- Wroblewski, T., Tomczak, A., y Michelmore, R. (2005). Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and Arabidopsis. *Plant Biotechnology Journal*, 3(2), 259-273. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2005.00123.x>
- Yang, H., Ren, S., Yu, S., Pan, H., Li, T., Ge, S., . . . Xia, N. (2020). Methods Favoring Homology-Directed Repair Choice in Response to CRISPR/Cas9 Induced-Double Strand Breaks. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18). <https://doi.org/10.3390/ijms21186461>

- Yang, X., Kundariya, H., Xu, Y.-Z., Sandhu, A., Yu, J., Hutton, S. F., . . . Mackenzie, S. A. (2015). MutS *HOMOLOG1*-Derived Epigenetic Breeding Potential in Tomato. *Plant Physiology*, 168(1), 222-232. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00075>
- Yoshida, K., Schuenemann, V. J., Cano, L. M., Pais, M., Mishra, B., Sharma, R., . . . Burbano, H. A. (2013). The rise and fall of the *Phytophthora infestans* lineage that triggered the Irish potato famine. *eLife*, 2, e00731. <https://doi.org/10.7554/eLife.00731>
- Zaidi, S. S.-e.-A., Vanderschuren, H., Qaim, M., Mahfouz, M. M., Kohli, A., Mansoor, S., y Tester, M. (2019). New plant breeding technologies for food security. *Science*, 363(6434), 1390-1391. <https://doi.org/10.1126/science.aav6316>
- Zehra, A., Meena, M., Dubey, M. K., Aamir, M., y Upadhyay, R. S. (2017). Synergistic effects of plant defense elicitors and *Trichoderma harzianum* on enhanced induction of antioxidant defense system in tomato against Fusarium wilt disease. *Botanical Studies*, 58(1), 44. <https://doi.org/10.1186/s40529-017-0198-2>

### XIII. Anexos

#### 13.1 Ilustración del cultivo *in vitro* y la transformación genética del tomate cv. Micro-Tom.



**Figura 12. Descripción ilustrativa del proceso de cultivo *in vitro* y transformación genética del tomate Micro-Tom.** (A) Preparación de cultivos de *A. tumefaciens* GV2260, incluyendo las líneas control negativo (C-), así como las líneas transformantes 203, M12 y ST4. (B) Procedimiento de inoculación de los explantes de tomate con las diferentes líneas de *Agrobacterium*. (C) Fase de infección y co-cultivo, donde los explantes inoculados son co-cultivados con *Agrobacterium* para facilitar la transferencia del material genético. (D-E) Exposición de controles (planta tipo “silvestre”, WT, y control negativo, C-) a higromicina para evaluar la eficacia del agente selectivo. (F) Selección de explantes transformados de las líneas 203, M12 y ST4, basada en su resistencia a higromicina. (G-H) Desarrollo progresivo del material vegetal regenerado en los diferentes medios de cultivo. (I-J) Trasplante y floración.

### 13.2 Documentos originados a partir de esta investigación

García-Murillo, L., Valencia-Lozano, E., Priego-Ranero, N. A., Cabrera-Ponce, J. L., Duarte-Aké, F. P., Vizuet-de-Rueda, J. C., . . . Alvarez-Venegas, R. (2023). CRISPRa-mediated transcriptional activation of the *SIPR-1* gene in edited tomato plants. *Plant Science*, 329, 111617. Enlace: [CRISPRa-mediated transcriptional activation of the SIPR-1 gene in edited tomato plants - ScienceDirect](#)

Priego-Ranero, N. A y., Alvarez-Venegas, R. (2022). CRISPRa: de la edición genómica a la edición epigenética vegetal. *Avance y Perspectiva*. Enlace: [CRISPRa: de la edición genómica a la edición epigenética vegetal » Avance y Perspectiva \(cinvestav.mx\)](#)

### Alojamiento de la Tesis en el Repositorio Institucional

<b>Título de la Tesis:</b>	Transformación genética del tomate Micro-Tom para la activación de un gen de defensa vía CRISPRa
<b>Autor:</b>	Nicolás Alberto Priego Ranero
<b>ORCID:</b>	<a href="https://orcid.org/0000-0001-8681-4715">https://orcid.org/0000-0001-8681-4715</a>
<b>Resumen:</b>	<p>Debido a las limitaciones ambientales y a la evolución continua de plagas y enfermedades agrícolas, se necesitan nuevas estrategias de protección de cultivos que permitan suministrar alimentos suficientes, nutritivos e inocuos a una población global en constante crecimiento. En plantas, las herramientas de regulación transcripcional y de edición epigenética basadas en el sistema CRISPRa ofrecen estrategias versátiles y reversibles para el mejoramiento de la resistencia a enfermedades compatibles con estos objetivos. Sin embargo, pese a su potencial en la agricultura, la aplicación del sistema CRISPRa ha estado restringido a plantas modelo con escasos rasgos de interés agronómico. Una alternativa a las plantas modelo convencionales es el cultivo de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.). Particularmente, el cultivar de tomate Micro-Tom posee propiedades genéticas y hortícolas que lo constituyen como un modelo atractivo para el estudio del sistema CRISPRa <i>in vivo</i>. En el presente estudio, se reporta la integración del sistema CRISPRa para la activación transcripcional y reprogramación epigenética del gen <i>PR-1</i> en el tomate Micro-Tom. La generación de plantas editadas se produjo a partir de la transformación estable de hipocótilos con <i>Agrobacterium</i>. Estas plantas demostraron ser resistentes a higromicina y se desarrollaron a partir de estructuras organogénicas y embrionarias. Adicionalmente, se implementó un método de transformación transitoria en explantes cotiledonares como alternativa al método de agroinfiltración sin que se presentaran efectos adversos asociados a la inoculación con <i>Agrobacterium</i>. Este trabajo representa un avance en la aplicación del sistema CRISPRa para el mejoramiento de la resistencia a fitopatógenos en plantas de importancia agrícola.</p>
<b>Palabras Clave:</b>	<i>SIPR-1</i> , CRISPRa, transformación genética, cultivo <i>in vitro</i> , protección de cultivos.