



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

**Tecnología CRISPR/Cas9 como herramienta para la
transformación genética de especies forestales en México.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO AGRÍCOLA

PRESENTA:

SERGIO EDUARDO HERNÁNDEZ BAUTISTA

Asesor:

Dra. María Elena Quintana Sierra.

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: DRA. MARÍA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis**

Tecnología CRISPR/Cas9 como herramienta para generar especies forestales mejoradas en México

Que presenta el pasante: **Sergio Eduardo Hernández Bautista**
Con número de cuenta: **415103686** para obtener el Título de: **Ingeniero Agrícola**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 30 de marzo de 2022.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Dra. Rosa Navarrete Maya</u>	<u>Rosa Navarrete Maya</u>
VOCAL	<u>Dra. María Elena Quintana Sierra</u>	<u>María Elena Quintana Sierra</u>
SECRETARIO	<u>M. en C. Nancy Berenice Martínez Valles</u>	<u>Nancy Berenice Martínez Valles</u>
1er. SUPLENTE	<u>Ing. Montserrat Tapia Hernández</u>	<u>Montserrat Tapia Hernández</u>
2do. SUPLENTE	<u>Ing. Edgar Orlando Sotelo Noguez</u>	<u>Edgar Orlando Sotelo Noguez</u>

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

MCVB/ntm*

Agradecimientos

Para la realización del presente trabajo primeramente quiero agradecer a mi Madre, quien, con su apoyo incondicional y constante, logre finalizar mis estudios de licenciatura.

Me gustaría agradecer a la UNAM por todas las oportunidades y facilidades que me permitieron desarrollarme académicamente y humanamente.

Quiero agradecer a la DGEI por el financiamiento económico que me permitió realizar estudios en la UPM en Madrid, España; donde tuve la oportunidad de desarrollar prácticas de biología molecular en plantas en el Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP), de donde derivo mi tema de tesis.

Quiero agradecer al Dr. Mariano Perales y a la Dra. Isabel Allona; quienes depositaron su confianza en mí para desarrollar análisis genéticos de plantas en los laboratorios del CBGP.

Agradezco al M.C. Paolo Triozzi y a la Biol. Daniela, quienes me instruyeron en las prácticas de biotecnología vegetal.

Agradezco a la Dra. Rosa Navarrete, por el apoyo constante para la redacción del documento.

Agradezco a la Dra. María Elena Quintana, por su apoyo y asesoría en la redacción del documento.

Agradezco al M.C. Oscar Horacio Guillén, por su apoyo y asesoría en la redacción del documento.

Agradezco a la Profesora Laura Núñez, quien me apoyo con la redacción y corrección del documento.

Agradezco a mis sinodales por su aportación y apoyo en la corrección del documento.

Dedicatorias

Me gustaría dedicar este documento a mi familia, a mis hermanos y hermanas, a mi madre Alicia Bautista Torres, quien amo mucho y estaré eternamente agradecido.

Dedico este trabajo a la memoria de mi Abuela Teresa Torres, quien me vio crecer y me dio su apoyo incondicional en todo momento.

También dedico a mi abuelo Pablo Bautista, quien siempre me ha apoyado en los proyectos que he realizado.

Quiero dedicar el trabajo a mis profesores y profesoras de la universidad, que cada uno de ellos puso su grano de arena en mi formación académica.

Dedico este trabajo a mi Tía Andrea, quien siempre me animó y apoyó para continuar con mis metas.

Dedico también a mis amigos y amigas, quienes son muchos, por compartir conmigo grandes momentos que hicieron más fácil la estancia en la universidad.

Dedico también a la memoria de la profesora Laura Núñez Balderas, quien más que una profesora fue una gran amiga, y a quien siempre recordaremos con mucho cariño y que sus enseñanzas seguirán aportando a la ciencia desde sus alumnos.

Sobre todo, dedico el presente trabajo a los amantes de las plantas y los bosques, a aquellos que cuidan y protegen los seres vivos.

Dedico a aquellos que hacen ciencia y la divulgan, pero sobre todo quienes la enseñan con mucho cariño y pasión.

Índice:

Agradecimientos.....	i
Dedicatorias.....	ii
Resumen.....	v
I. Introducción.....	1
II. Objetivo.....	2
III. Justificación.....	2
IV. Metodología.....	2
V. Resultados.....	3
1. Importancia de los bosques.....	3
2. Cambios negativos en superficie forestal mundial.....	4
3. Cambios negativos en superficie forestal de México.....	7
4. Tierras secas en México y el mundo.....	9
5. <i>Descubrimiento de la tecnología CRISPR/Cas9</i>	11
6. Mecanismo y componentes del sistema CRISPR/Cas9.....	12
6.1. <i>Adquisición de la secuencia espaciadora</i>	12
6.2. Expresión y formación del complejo CRISPR/Cas9.....	13
6.3. Reconocimiento de la secuencia PAM e interferencia.....	13
7. Vías de reparación de la célula eucariota ante rupturas del DNA.....	15
8. Breve comparación de algunas características de la tecnología CRISPR/Cas9 con otras tecnologías de edición genómica: ZFNs y TALENs.....	16
9. Algunas aplicaciones de la tecnología CRISPR/Cas9 desarrolladas en plantas.....	19
10. Algunas aplicaciones de la tecnología CRISPR/Cas9 desarrolladas en forestales.....	23
11. Organismos genéticamente editados (GE) y Organismos genéticamente modificados (GMO).....	25
VI. Análisis de resultados y discusión.....	28
VII. Conclusión.....	36
VIII. Bibliografía.....	38
IX. Anexos.....	44

Índice de figuras.

Figura 1. Variación anual neta de la superficie forestal, por decenios y por región del mundo, 1990-2020.....	4
Figura 2. Área de bosque mundial 1990-2020	5
Figura 3. Extracción de madera anual por región, 1990-2011.....	6
Figura 4. Producción forestal según especie en México 1990-2014.....	8
Figura 5. Situación sanitaria de los árboles en México.....	8
Figura 6. Distribución de las tierras secas en el mundo.....	9
Figura 7. Distribución de las tierras secas en México.....	10
Figura 8: Clasificación de los sistemas CRISPR.....	12
Figura 9: Incisión de la doble cadena de DNA por el complejo CRISPR/Cas9.....	14
Figura 10: Representación del mecanismo del sistema CRISPR/Cas9.....	14
Figura 11: Vías de reparación de la ruptura de la doble cadena de DNA.....	16
Figura 12. Eficiencia de transformación mediante CRISPR/Cas9 contra las tecnologías ZFNs y TALENs para ciertos genes.....	17
Figura 13. Eficiencia de transformación Zea mays mediante CRISPR/Cas9 contra TALENs para cierto gen.....	18
Figura 14. Manipulación genética de genes mediante CRISPR/Cas9 y TALENs.....	18
Figura 15. Estrés por sequía en plantas testigo y mutantes del gen <i>slnpr1</i> en <i>Solanum lycopersicum</i>	20
Figura 16. Plantas testigo y mutantes del gen ALS en sandía con aplicación de producto químico Tribenuron a los 17 y 68 días.....	20
Figura 17. Hojas de plantas testigo y mutantes de <i>Citrus sinensis</i> a los 6 y 12 días después de inoculación con <i>Xanthomonas citri</i>	21
Figura 18. Tiempos de desarrollo del protocolo para generar plantas mutantes en <i>Coffea</i> spp.....	22
Figura 19. Brotes albinos de <i>Malus domestica</i>	22
Figura 20. Extracción de celulosa.....	23
Figura 21. Plantas mutantes del gen BRC2 en <i>Populus</i> spp.....	24
Figura 22. Mutación del gen GFP en tejidos embrionarios de <i>Cryptomeria japonica</i>	24
Figura 23. Nódulos en plantas testigo y plantas mutantes en <i>Parasponia</i> spp.....	25

Resumen.

Los bosques juegan un papel importante en los procesos naturales y ecológicos, por los muchos beneficios que brindan. En una evaluación mundial de los bosques, la FAO informa que la superficie forestal ha disminuido considerablemente en los últimos años, evidentemente en respuesta a diversos factores que han complicado la adaptación y regeneración de las especies forestales, ante nuevas condiciones ambientales. Esta reducción ha afectado a muchos otros ecosistemas y también a ciclos que requieren de los servicios ambientales que los bosques proveen. De ahí recae la gran importancia de desarrollar estudios para generar programas de mejoramiento genético en especies forestales, que garanticen su adaptación y supervivencia en ambientes extremos. Actualmente se ha desarrollado una tecnología innovadora llamada CRISPR/Cas9, que consiste de un sistema inmunitario de bacterias, el cual ha sido adaptado para su aplicación en la edición del genoma. Con el apoyo de ésta tecnología, se han desarrollado diversas investigaciones para el mejoramiento genómico de especies vegetales en todo el mundo, donde el estudio de la genómica forestal ha cobrado gran importancia, sin embargo, pocos países se han interesado en ampliar su estudio, debido a las regulaciones que presenta el uso de tecnologías moleculares, sin embargo, recientemente se han logrado avances significativos en especies modelo y de importancia económica a nivel laboratorio. En México hay mucho trabajo por desarrollar en el sector forestal, ya que tiene serios problemas por la pérdida acelerada de sus bosques a causa del cambio climático, deforestación, cambio de uso de suelo, falta de legislación para la protección de reservas y áreas protegidas, etc. Una solución potencial ante dicha problemática es sin lugar a duda, la tecnología CRISPR/Cas9 que se puede aplicar para obtener especies forestales mejoradas genéticamente en un tiempo menor, a diferencia de las técnicas de mejoramiento tradicional.

I. Introducción.

En el presente trabajo se realizó una revisión bibliográfica, de las aplicaciones de la tecnología CRISPR/Cas9 que han surgido en el área vegetal, con las cuales se tendrán las bases y fundamentos para proponer a la tecnología como una herramienta en México, para desarrollar programas de mejoramiento genético en especies forestales.

La importancia de optar por tecnologías rápidas y eficientes para el mejoramiento genético de especies forestales es indispensable, ya que con el reciente panorama de condiciones extremas debido al cambio climático, suelos dañados, plagas y enfermedades; aunado a la extracción de recursos forestales para abastecer la demanda de la creciente población, todo en conjunto, complica la adaptación y regeneración de muchas especies forestales, lo que sin duda ha provocado la disminución de la superficie forestal mundial.

Se realizó la búsqueda y recopilación de información de documentos digitales, así como de publicaciones científicas y archivos de evaluaciones nacionales e internacionales; donde se revisó y se analizó el cambio negativo de la superficie forestal en el país y el mundo; también se revisaron algunas de las causas que están influyendo en el deterioro de estos ecosistemas.

Es necesaria la aplicación de tecnologías moleculares como CRISPR/Cas9 para ampliar el conocimiento de la genómica forestal; mediante el cual se podrán generar especies forestales con rasgos adaptativos que favorezcan su subsistencia en condiciones donde se complica su desarrollo.

II. Objetivo.

Proponer a la tecnología CRISPR/Cas9 como una herramienta para generar especies forestales mejoradas en México.

III. Justificación.

Con la revisión y recopilación de información reciente de las aplicaciones de la tecnología CRISPR/Cas9 en plantas, se tendrán los fundamentos y las bases para proponer a esta tecnología, como una herramienta para generar especies forestales mejoradas en México.

IV. Metodología:

Se recopiló información de los antecedentes y aplicaciones de la tecnología CRISPR/Cas9 en plantas, donde se analizó su aplicación en el área forestal para mejorar especies forestales. Se revisó también el cambio negativo que ha presentado la superficie forestal en México y el mundo en los años anteriores; donde se analizaron algunas causas naturales y antropogénicas que están contribuyendo a la disminución de su superficie.

V. Resultados.

1. Importancia de los bosques.

Los bosques proveen muchos beneficios al planeta, además de ser el sustento de la población humana desde inicios de su historia. De estos ecosistemas se han obtenido diversos bienes y de ellos dependen muchos procesos naturales y ecológicos (SEMARNAT, 2019). Actualmente se estima un área total de 4060 millones de hectáreas de bosque que corresponde al 31% de la superficie total de la tierra (FAO, 2021).

Los bosques brindan importantes beneficios al planeta y a los seres vivos (MacDicken *et al.*, 2016).

1. Protegen y conservan los recursos naturales.
2. Frenan la dispersión del agua y favorecen la infiltración de las aguas pluviales.
3. Protegen los suelos de la erosión eólica, hídrica y desastres naturales.
4. Proporcionan hábitats que favorecen a la biodiversidad y el desarrollo de procesos ecológicos.
5. Mantienen los sistemas y ciclos ecológicos que contribuyen al reciclado del carbono y el agua.
6. Contribuyen al bienestar humano mediante la lucha contra la pobreza rural y al logro de la seguridad alimentaria.
7. Proveen servicios ambientales como el aire y agua limpios.
8. Mitigan los efectos del cambio climático mediante la reducción de las emisiones netas de gases de efecto invernadero.
9. Producen la mayor parte de los productos forestales mundiales.
10. Funcionan como sumideros y fuentes de carbono.
11. Tienen importancia cultural, religiosa y recreativa para quienes los usan.

Además, en estos ecosistemas se desarrollan actividades forestales que son fuente de ingreso y desarrollo local, por lo que la importancia del desarrollo forestal sustentable es invaluable (Chapela y Merino, 2019).

“En la Conferencia de las Partes de la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático, celebrada en París en diciembre de 2015, se alcanzó un acuerdo mundial incluyente sobre el cambio climático en el que los bosques tienen un papel fundamental” (MacDicken *et al.*, 2016).

2. Cambios negativos en superficie forestal mundial.

El territorio mundial de los bosques ha cambiado considerablemente a lo largo de los años, debido a diversos factores naturales y antropogénicos. Algunos cambios han resultado positivos en algunas regiones del planeta que han preservado la biodiversidad, pero también han habido cambios negativos como se muestra en la figura 1 (FAO, 2021).

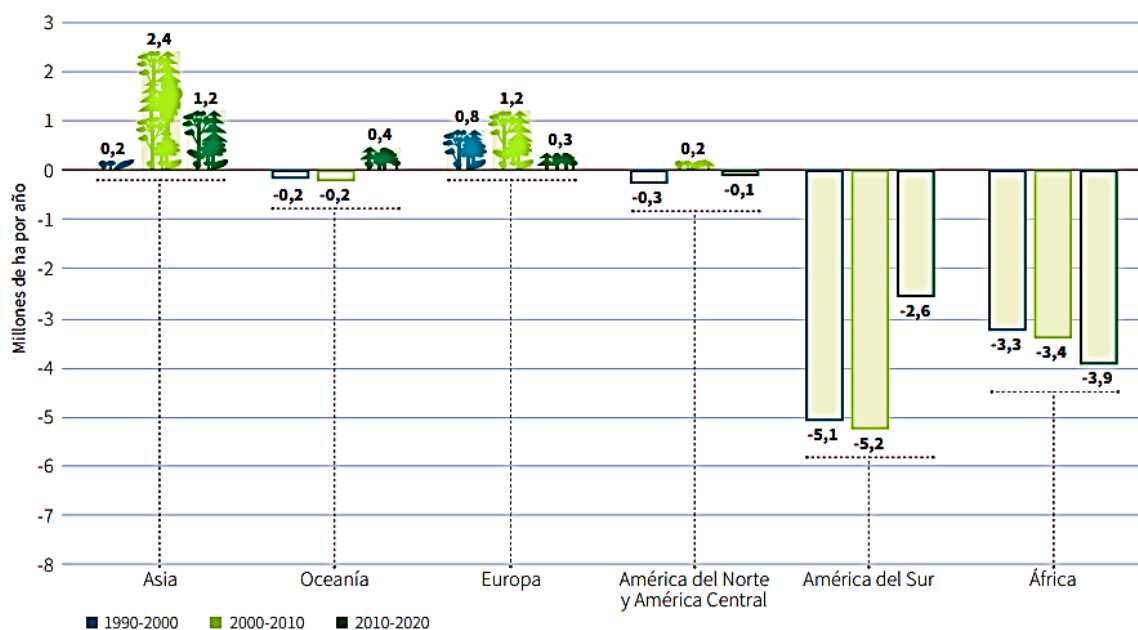


Figura 1. Variación anual neta de la superficie forestal, por decenios y por región del mundo, 1990-2020 (FAO, 2021).

De acuerdo a la evaluación de los recursos forestales mundiales realizada por la FAO en el año 2021, indica que del año 1990 al año 2020 ha habido una reducción en la superficie de los bosques en el mundo, estimándose una pérdida de 178 millones de ha de bosque (FAO, 2021)). En el año 1990 el área mundial estimada de los bosques fue 4,236,433,000 de hectáreas (ha) y paulatinamente la superficie forestal ha disminuido, registrándose una estimación de 4,058,931,000 de ha para el año 2020 (Fig. 2).

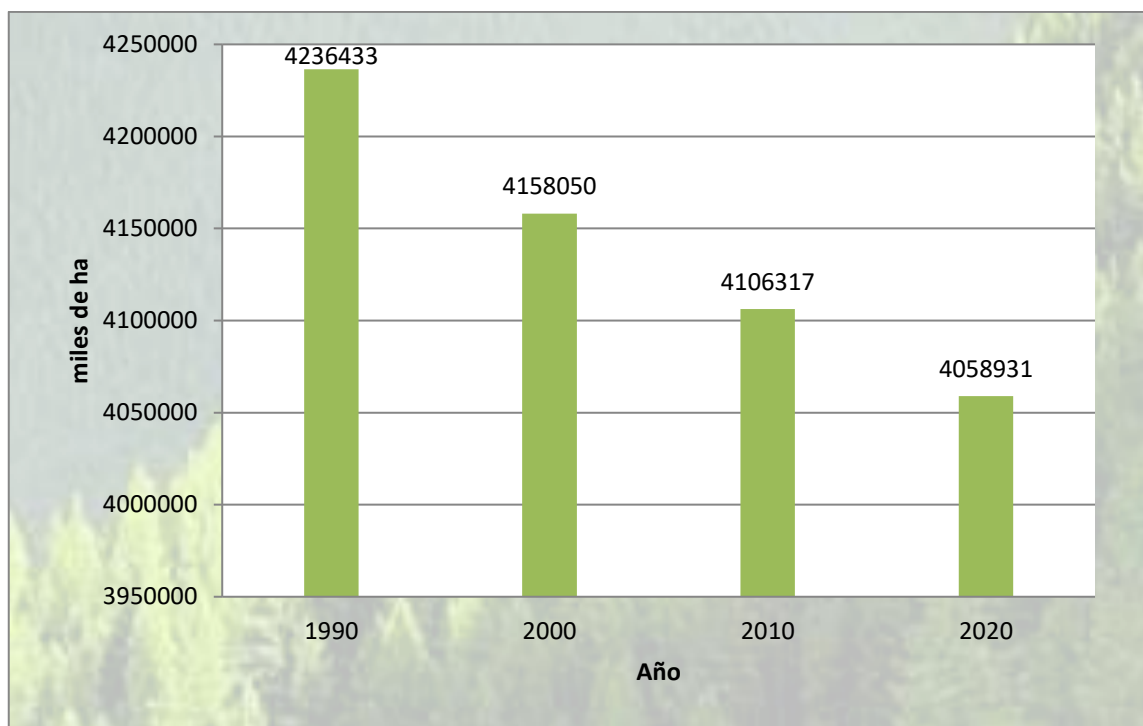


Figura 2. Área de bosque mundial 1990-2020 (FAO, 2021).

La disminución de la superficie forestal mundial, sin duda ha ocurrido en respuesta a diversos factores, siendo numerosas las perturbaciones que afectan negativamente a la salud y vitalidad del arbolado. En el FRA 2020, se informa sobre la superficie de bosque afectada anualmente por las perturbaciones, definida como todo factor biótico o abiótico que afecte negativamente al vigor y la productividad del bosque y que no sea resultado directo de las actividades humanas, es decir a la superficie de bosque afectada por insectos, enfermedades (causadas por bacterias, hongos, fitoplasmas o virus) y fenómenos meteorológicos graves (por ejemplo, nieve, tormentas o sequías) en el período 2000-2017 (FAO, 2021).

A nivel mundial se ha estimado un 1.4% de área de bosque afectado por insectos, correspondiente a 29,119,000 de ha; mientras que el área mundial de bosque afectado por enfermedades representa el 0,4%, correspondiente a 4,757,000 ha. Por otro lado, el área mundial de bosque afectado por fenómenos meteorológicos graves ha sido del 0,3% (FAO, 2021).

Por otro lado, las actividades forestales como la extracción de madera han representado una oportunidad de ingresos y aportaciones al PIB mundial; tan solo en el año 2011, se estimó la extracción de 3,000 millones de metros cúbicos, aportando 600 millones de USD al PIB mundial. En América del Norte y América Central fueron las regiones que más extracción presentaron (Fig. 3). Esta ganancia benefició económicamente a muchos países, pero en otros términos también ha contribuido a la pérdida parcial de cobertura de copas mundial (PPCC) (MacDicken *et al.*, 2016).

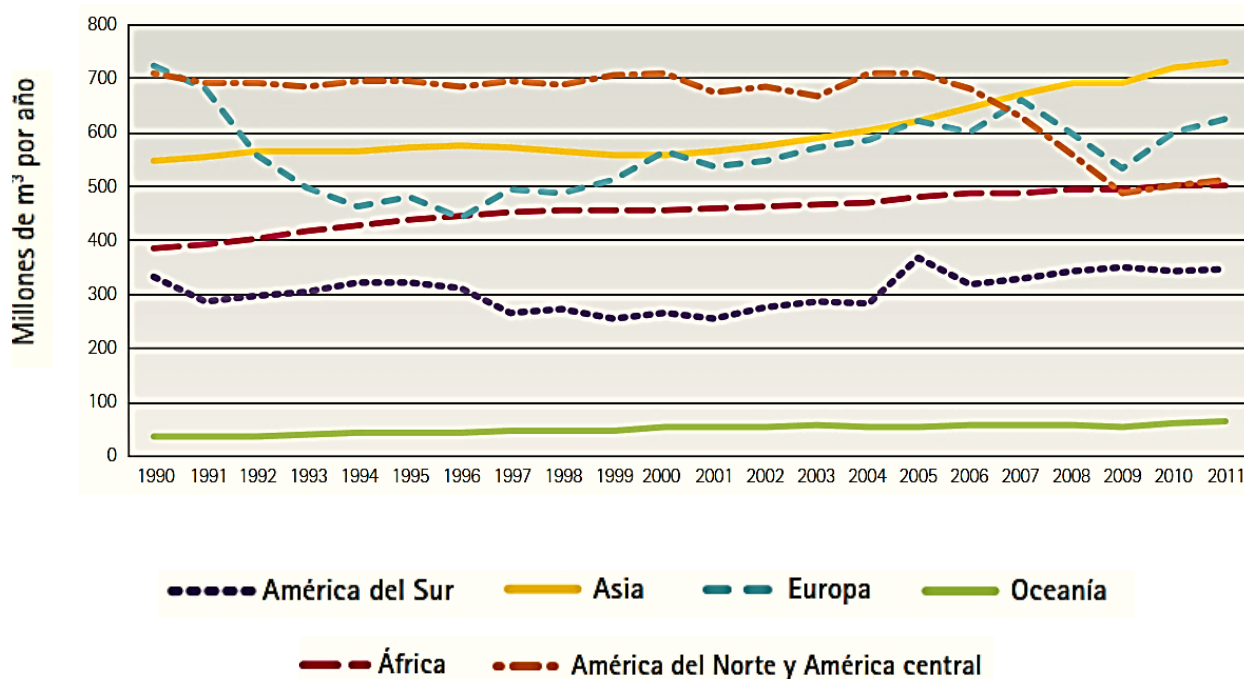


Figura 3. Extracción de madera anual por región, 1990-2011 (MacDicken *et al.*, 2016).

En el periodo del año 2000 al año 2012 la PPCC de los bosques en el mundo fue de 185 millones de ha, siendo las zonas tropicales quienes presentaron cifras altas de pérdida con más de 156 millones de ha. La PPCC en efecto contribuye directamente a la disminución de biomasa forestal mundial (MacDicken *et al.*, 2016). La biomasa forestal es un indicador muy importante porque mediante este componente se estima la capacidad que tienen los bosques de absorber el elemento carbono de la atmósfera; se ha estimado que los bosques del planeta almacenan 296 gigatoneladas(Gt) de carbono (SEMARNAT, 2019).

3. Cambios negativos en superficie forestal de México.

En México se sitúa el 2.1% de la superficie forestal mundial, dentro de la cual se resguarda una gran biodiversidad (Chapela y Merino, 2019). En esta superficie encontramos ecosistemas terrestres como bosques mesófilos de montaña, bosques templados, selva húmeda y selva subhúmeda. En el periodo del año 2000 al año 2015 la tasa neta anual de deforestación en estos ecosistemas fue de 121,000 ha. En el periodo comprendido de los años 70´s al año 2014 se han perdido 23 millones de ha de selva y 13 millones de ha de bosque en el país y en respuesta a ello, en el periodo del año 2003 al año 2016, las emisiones anuales promedio de CO₂ ascendieron a 7189 Gt. (SEMARNAT, 2019).

La producción forestal nacional se concentra en las zonas templadas; el cual un 84% de la madera extraída se obtiene de especies como *Pinus* Spp, *Abies religiosa*, *Cedrus* spp y *Quercus* spp; el 4.7% proviene de especies tropicales comunes y el 0.5% de especies de maderas preciosas (Fig. 5). El principal destino que se le da a la madera extraída es para producción de escuadría con alrededor del 70% destinado para este fin, la extracción de celulosa en un 11.6%, carbón con 5.2%, y también chapa y triplay con el 4.9% (SEMARNAT, 2019).

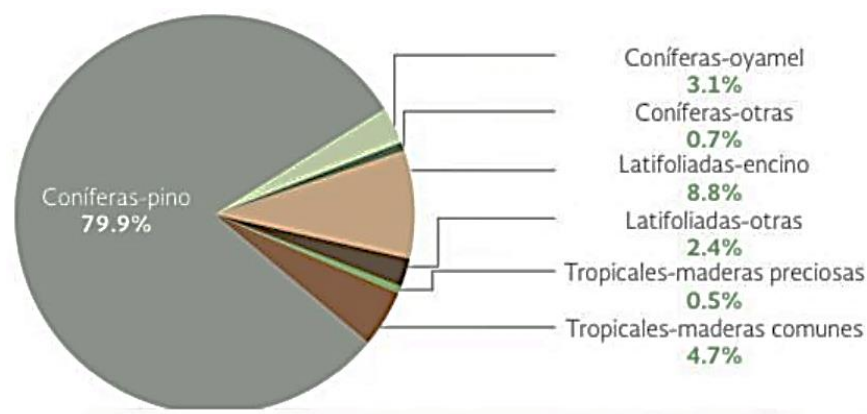


Figura 4. Producción forestal según especie en México 1990-2014 (SEMARNAT, 2019).

Uno de los factores naturales que han contribuido al deterioro de los bosques en el país son las plagas y enfermedades donde se han registrado alrededor de 70 especies de insectos y patógenos que afectan a las especies forestales (ver anexo 2). Entre el año de 1990 al año 2017, la superficie promedio anual nacional afectada por patógenos fue de 56,227 ha. Anteriormente citado, el 84% de la producción forestal maderable del país proviene de las zonas templadas, donde se encuentra la mayor afectación; como por ejemplo el *Conophthorus edulis* que afecta a áreas de *Pinus pinea*, *Arceuthobium blumeri*, que afecta a vegetación de bosque templado, *Fusarium circinatum* que también afecta a vegetación de bosque templado entre otros patógenos (ver anexo 2)(SEMARNAT, 2019).

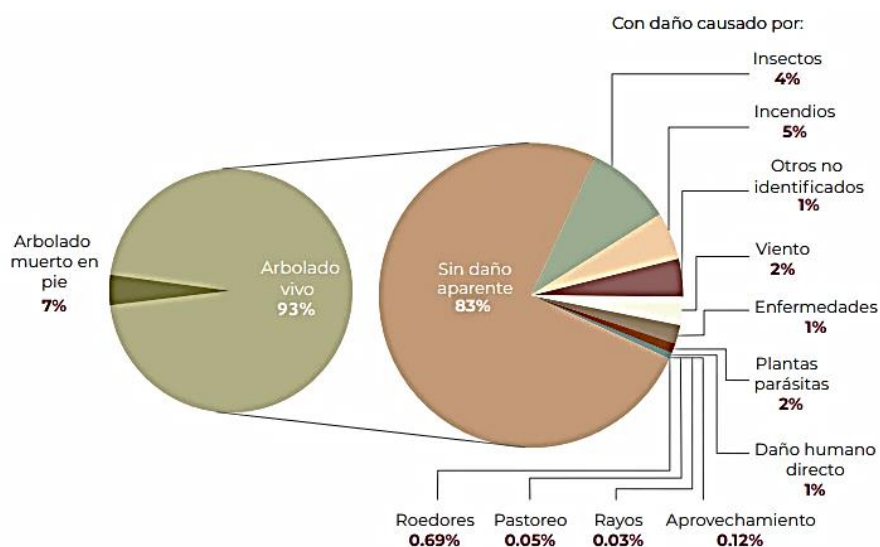


Figura 5. Situación sanitaria de los árboles en México (SEMARNAT, 2019).

4. Tierras secas en México y el mundo.

Las Naciones Unidas definen a las tierras secas por el índice de aridez (IA) que presentan. Su denominación se basa en el resultado de la división de la precipitación anual de cierto lugar entre la evapotranspiración potencial anual del mismo. Las zonas donde el índice de aridez es menor a 0.65 se les denomina como tierras secas. La superficie de estas tierras en el mundo es de 6.1 millones de ha, lo que equivale al 41% de la superficie terrestre mundial (Patriarca *et al.*, 2019).

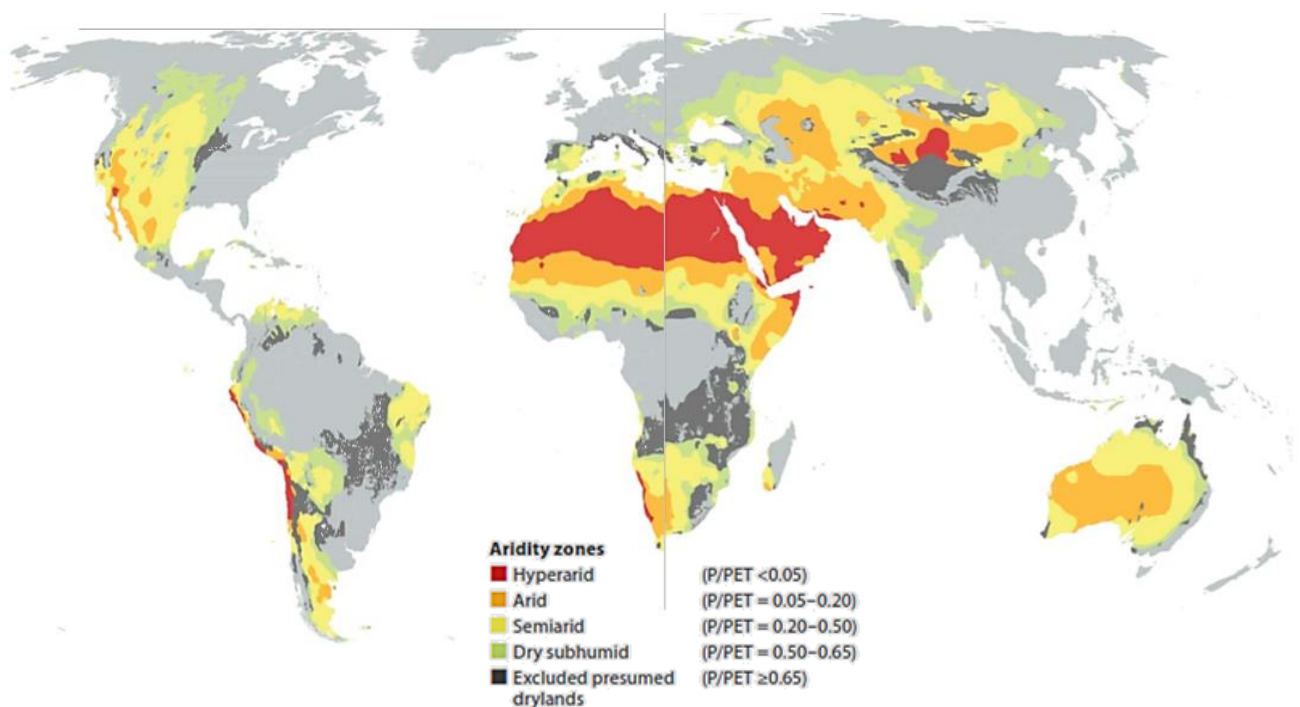


Figura 6. Distribución de las tierras secas en el mundo (Patriarca *et al.*, 2019).

En las zonas áridas las condiciones extremas de temperatura y baja disponibilidad hídrica dificultan el desarrollo de varias especies vegetales. De acuerdo a Bastin *et al.*, (2017), las nuevas condiciones derivadas del cambio climático y el creciente aumento de la población humana atentan directamente la degradación y desertificación de más superficie terrestre, favoreciendo la formación de mayor superficie de tierras secas.

En un escenario donde las zonas áridas aumenten en lugares donde no habían, conllevaría a que muchas especies que habitan en esas zonas se adapten o perezcan. Para que organismos como las plantas, se adapten a un medio con nuevas condiciones, se requiere de nuevas mutaciones y al menos para el caso de las especies leñosas la probabilidad es baja, debido a los tiempos largos de generación (Fernandez i Marti y Dodd, 2018).

Revisando el caso de México, en el año 2013 se estimó que el 65% del territorio nacional está ocupado por estas tierras secas, lo que equivale a un poco más de 125 millones de ha de tierras secas en el país. (SEMARNAT, 2019).

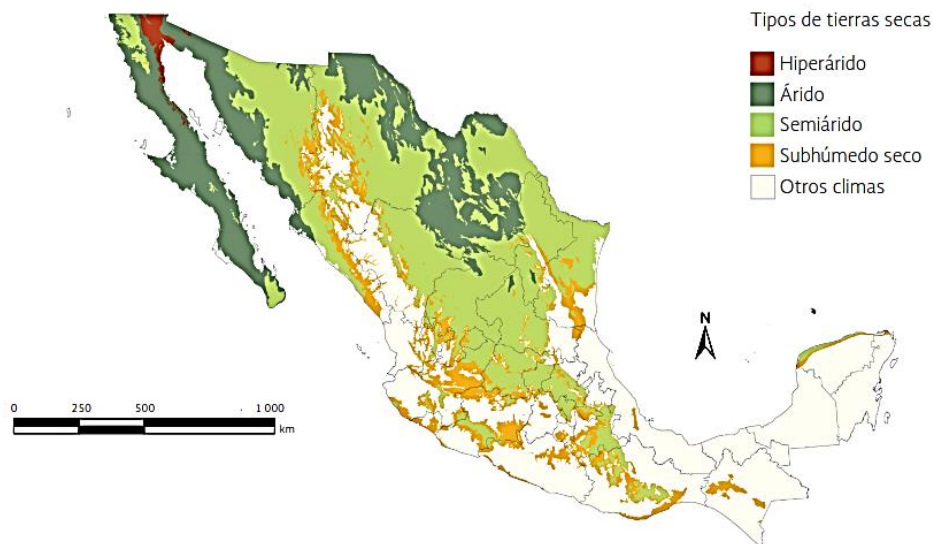


Figura 7. Distribución de las tierras secas en México (SEMARNAT, 2019).

Dentro de la superficie de tierras secas del país, se presentan niveles altos de desertificación que afectan a 85.7 millones de ha del territorio nacional. En el año 2014 se implementaron programas para la restauración, donde apenas el 0.2 % de estos suelos fueron atendidos; esto equivale a 163.1 mil ha de superficie de suelo dañado (SEMARNAT, 2019).

5. Descubrimiento de la tecnología CRISPR/Cas9.

En la década de los 80's y mitad de 90's del siglo pasado, investigadores trabajando con el genoma de bacterias y Arqueas observaron secuencias de repeticiones agrupadas de manera consecutiva. Analizaron que estas repeticiones podrían desempeñar alguna función importante, por lo que dedujeron que podrían servirles como información de adaptación a ambientes extremos. Dando seguimiento a esas investigaciones se identificaron genes asociados a estos replicones, a los cuales se denominaron CRISPR-Associated (Cas); lo que indicó que estas secuencias estaban asociadas a un sistema complejo de proteínas (Mojica y Garrett, 2013).

Estudios posteriores revelaron la relación que existía entre los genes Cas con las proteínas asociadas a esos replicones, los cuales constituyen un sistema inmune adaptativo de defensa de bacterias ante invasiones de fagos y plásmidos, el cual es guiado por un RNA codificado por el loci CRISPR junto con los genes asociados a CRISPR (Cas), que proveen inmunidad a estos organismos (Jiang y Doudna, 2017).

Se han estudiado a estos sistemas y se les ha agrupado en 2 clases, de acuerdo al tipo y número de proteínas Cas que lo conforman. Los sistemas de la clase 1 requieren de la intervención de múltiples proteínas Cas, y los sistemas de la clase 2 contienen 1 solo gen que codifica una sola proteína (Doudna, 2017).

En la figura 8 se ilustran a los sistemas Cas de acuerdo a su intervención. En color morado se ilustran a las proteínas Cas que participan en el procesamiento del Pre-crRNA, las de color naranja y amarillo se encargan de realizar la modulación del crRNA y localización de la secuencia objetivo, las de color azul se encargan de insertar secuencia espaciadora en el loci CRISPR y por último se encuentran las proteínas Cas en color verde y café; las cuales se desconoce su función (Mohanraju *et al.*, 2016).

La proteína Cas9 está clasificada en la clase II, separada como tipo II y se encuentra ilustrada como proteína de interferencia. Esta endonucleasa reconoce la doble cadena de DNA y lugar de incisión (Jiang y Doudna, 2017).

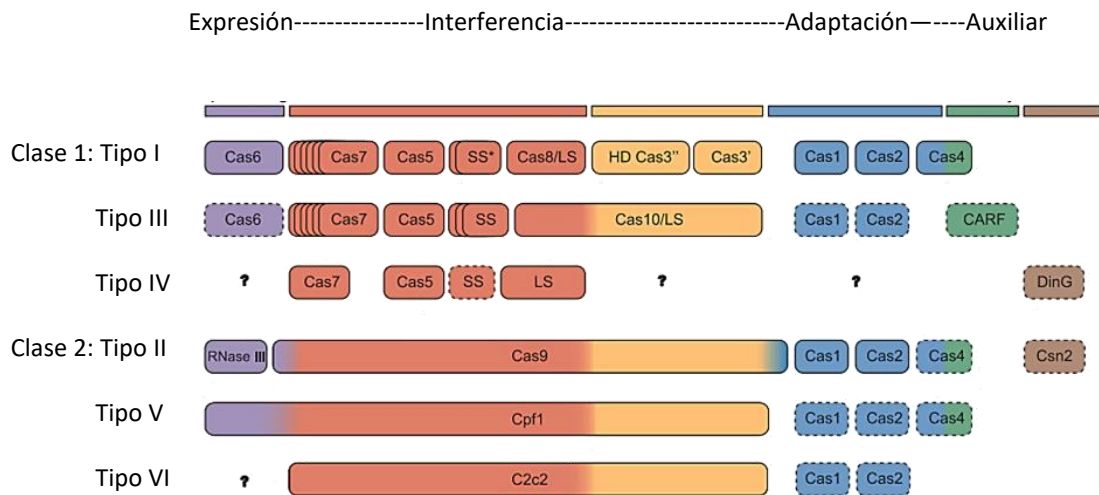


Figura 8. Clasificación de los sistemas CRISPR (Mohanraju *et al.*, 2016).

6. Mecanismo y componentes del sistema CRISPR/Cas9.

El sistema CRISPR/Cas9, como anteriormente se mencionó, es un sistema que confiere inmunidad a la bacteria para defenderse ante el ataque de un material genético invasor. Para darnos una idea de su mecanismo de inmunidad revisemos como lleva a cabo este proceso.

6.1 Adquisición de la secuencia espaciadora.

Para que la bacteria tenga inmunidad ante un invasor, sin duda alguna la adquisición de la secuencia corta que toma del invasor es un proceso muy importante. Esto inicia al ocurrir una invasión, donde los sistemas Cas seleccionan y procesan el DNA invasor. Toman una secuencia corta y la direccionan al loci CRISPR para integrarla como una secuencia espaciadora (Mohanraju *et al.*, 2016). De esta manera las bacterias tienen un registro genético de infección para reconocer a un invasor en futuras infecciones (Jiang y Doudna, 2017).

6.2. Expresión y formación del complejo CRISPR/Cas9.

En una segunda infección de algún invasor de la misma especie, la maquinaria CRISPR cuenta con los medios para interferir. Pero para que la interferencia se lleve a cabo, primero se requiere de la expresión de la maquinaria Cas que conforma al complejo CRISPR. El loci CRISPR se transcribe en un solo RNA, formando un pre-cr-RNA. Posteriormente se transcriben otras secuencias de RNA; los RNA transactivadores (tracr-RNA), los cuales se conjugaran con los pre-cr-RNA.

En la conjugación resultante se encuentran integradas distintas secuencias espaciadoras; por lo que una ribonucleasa III separará a este RNA conjugado en conjuntos de secuencias de espaciadores individuales, formando las secuencias RNA CRISPR maduras (crRNA).

Para finalizar con el proceso de expresión del complejo; se transcribirá y se traducirá una enzima Cas del tipo II (Cas9) el cual se unirá al crRNA para formar el complejo CRISPR/Cas9. (Jiang y Doudna, 2017).

6.3. Reconocimiento de la secuencia PAM e interferencia.

Con la formación del complejo CRISPR/Cas9 ahora se puede realizar la interferencia. Este proceso no se llevaría a cabo con exactitud de no ser por un componente importante que solo se encuentra en el genoma del invasor; el cual es una secuencia corta que se encuentra a un lado de la secuencia blanco; el motivo adyacente al protoespaciador (PAM). Esta secuencia PAM es importante para la distinción de secuencias propias adquiridas y la secuencia blanco a incidir. Cuando el complejo CRISPR/Cas9 reconoce a esta secuencia PAM, prosigue a emparejar la secuencia espaciadora con el protoespaciador; así mediante las nucleasas dominantes HNH y RuvC se realiza la incisión de la doble cadena de DNA blanco, llevándose a cabo la interferencia e eliminación del invasor (Jiang y Doudna, 2017).

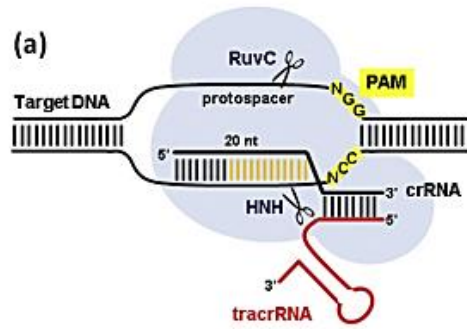


Figura 9. Incisión de la doble cadena de DNA por el complejo CRISPR/Cas9 (Bortesi y Fischer, 2014).

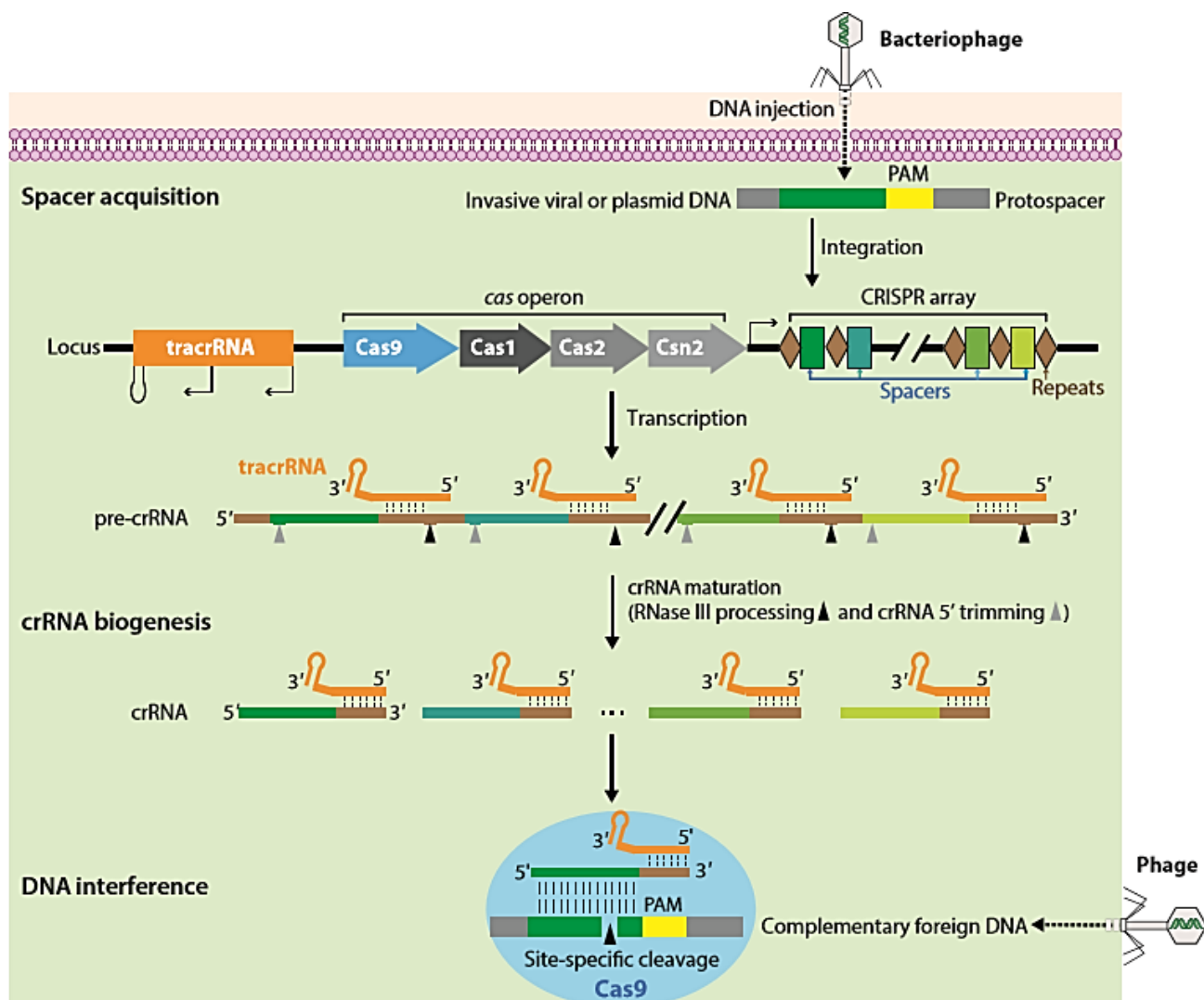


Figura 10. Representación del mecanismo del sistema CRISPR/Cas9 (Jiang y Doudna, 2017).

Con el apoyo de todos estos estudios, investigadores liderados por J. Doudna y E. Charpentier aplicaron la tecnología CRISPR/Cas9 para editar el genoma en células vivas, quienes en mayo del año 2012 registraron su aplicación en procariontes ante la oficina de patentes y marcas de los Estados Unidos. Sin embargo en diciembre del mismo año, otro grupo de investigadores liderados por Feng Zhang registró también la aplicación de la tecnología en eucariontes. La patente fue otorgada al equipo de Zhang en Estados Unidos en el año 2014, lo que generó una guerra de patentes debido a la amplia practicidad que se estaba desarrollando. Actualmente el derecho de patente sigue en discusión, ya que tanto en los Estados Unidos como otros países han otorgado el reconocimiento de patente únicamente a uno de ambos equipos de investigadores (Medvedieva y Blume, 2018).

Sin lugar a duda todos los equipos de investigación que aplican y estudian la tecnología han aportado importantes avances, y en evidencia se encuentran la infinidad de aplicaciones que se han desarrollado en diversas ramas de la ciencia.

7. Vías de reparación de la célula eucariota ante rupturas del DNA.

Las aplicaciones en células animales y vegetales se han logrado bajo el mismo principio de incisión que el sistema CRISPR/Cas9 realiza en cierta secuencia específica de DNA. Evidentemente se han desarrollado ajustes al complejo CRISPR/Cas9 para desarrollar este proceso; donde el complejo CRISPR incide en la secuencia objetivo y el DNA se repara bajo mecanismos propios de las células eucariotas.

Dicho anteriormente, las células eucariotas tienen mecanismos precisos y rápidos de reparación ante rupturas de la doble cadena de DNA (Davis y Chen, 2013). Se han definido dos vías diferentes de reparación; la recombinación no homóloga o unión de extremos no homólogos (NHEJ) y la recombinación dirigida por homología (HDR). La vía de reparación no homóloga es la vía más común en muchos organismos. En plantas grandes, la vía de reparación no homóloga es la vía predominante (Bortesi y Fischer, 2014).

Cuando CRISPR/Cas9 realiza el corte de la doble cadena de DNA, ésta se vuelve a ligar a través del proceso no homólogo. En este proceso de reparación ocurren cicatrices en forma de mutaciones de inserción o eliminación, al no haber una plantilla guía de reparación, como en la reparación homóloga (Ran *et al.*, 2013).

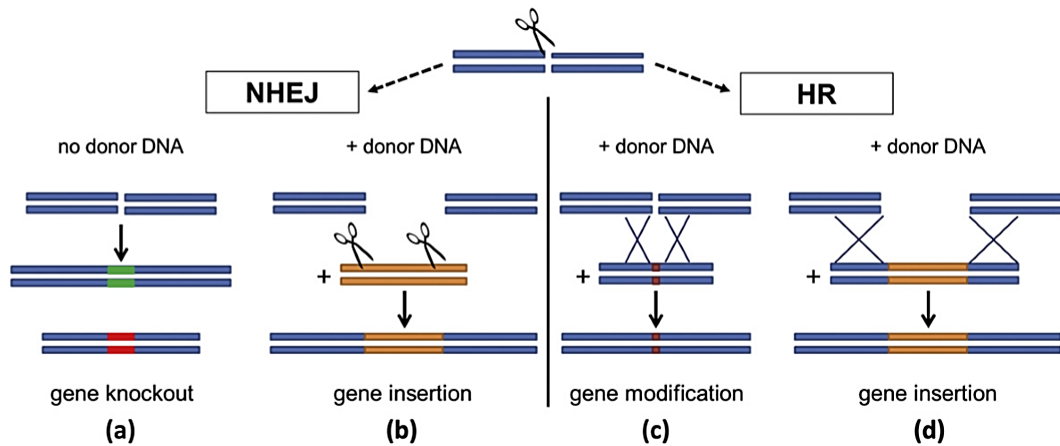


Figura 11. Vías de reparación de la ruptura de la doble cadena de DNA (Bortesi y Fischer, 2014).

8. Breve comparación de algunas características de la tecnología CRISPR/Cas9 con otras tecnologías de edición genómica: ZFNs y TALENs

La tecnología CRISPR/Cas9 ha resultado ser una tecnología muy innovadora para la manipulación del genoma, pero también se encuentran otros sistemas que se han utilizado con el mismo propósito. Dentro de esos sistemas están las nucleasas tipo activadores de transcripción (TALENs) y las nucleasas de dedos de zinc (ZFNs). Estas tecnologías de edición han demostrado ser rápidas para realizar el mejoramiento genético de plantas a diferencia de tecnologías de mejoramiento tradicional (Khatodia *et al.*, 2016).

Sin embargo la tecnología CRISPR/Cas9 ha demostrado ser más eficiente y sencilla de diseñar a diferencia de ZFNs y TALENs (Jiang y Doudna, 2017), que de acuerdo a algunos investigadores son costosas y laboriosas de diseñar, debido a la naturaleza de interacción entre los dedos de zinc y el DNA para el caso de ZFNs (Bortesi y Fischer, 2014).

En CRISPR/Cas9, la localización de la secuencia blanco es dirigida por una secuencia corta de RNA de 20 nucleótidos (Jiang y Doudna, 2017), lo que hace

a CRISPR fácil de diseñar a diferencia de TALENs que se requiere de más tiempo para la construcción de dos genes TALENs para reconocer a una nueva secuencia (Ran *et al.*, 2013).

El corte que realiza Cas9 es mediante dos dominios de incisión conocidos como RuvC y HNH mientras que en ZFNs y TALENs el dominio catalítico es mediado por la nucleasa de restricción FokI (Bortesi y Fischer, 2014). Antes de que FokI realice el corte en la secuencia objetivo, TALENs debe dimerizarse para que cada TALENs localice a cada cadena de DNA (Applied Biological Materials, 2020).

En un estudio con células domésticas de animales, se comparó la eficiencia de knock-in (KI) de CRISPR/Cas9 contra ZFNs y TALENs para ciertos genes. La eficiencia de KI de CRISPR/Cas9 y ZFNs fue de un 77.02% contra un 13.68% respectivamente, mientras que la eficiencia de CRISPR/Cas9 contra TALENs fue de 70.37% con CRISPR&Cas9 y 32.35% con TALENs (Hui *et al.*, 2018).

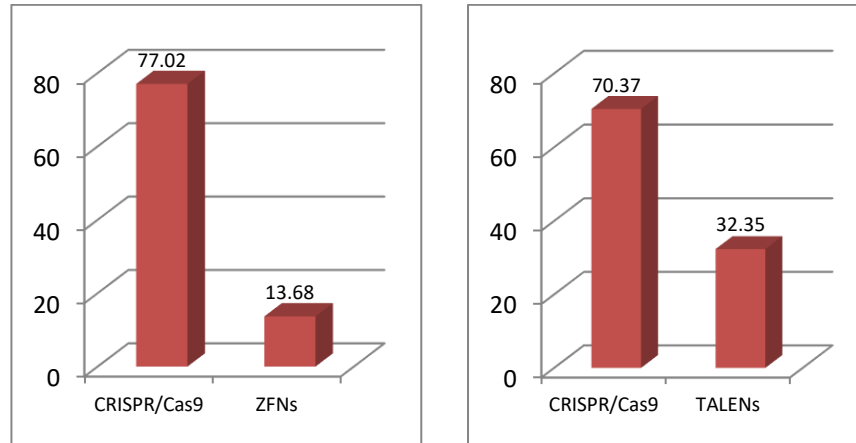


Figura 12. Eficiencia de transformación mediante CRISPR/Cas9 contra las tecnologías ZFNs y TALENs para ciertos genes (Hui *et al.*, 2018).

En plantas se ha demostrado que el sistema CRISPR/Cas9 genera altas tasas de mutación. En un estudio en maíz se comparó la eficiencia de TALENs y CRISPR/Cas9 donde se obtuvo una eficiencia del 13.1% con CRISPR/Cas9 y 9.1% mediante TALENs (Bortesi y Fischer, 2014).

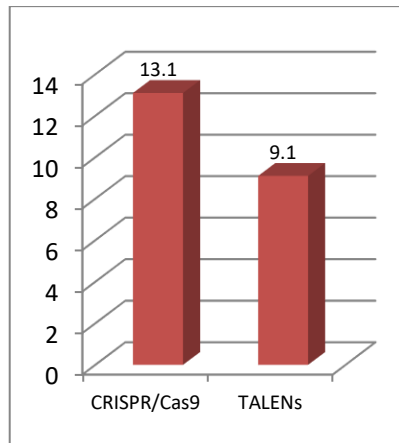


Figura 13. Eficiencia de transformación en *Zea mays* mediante CRISPR/Cas9 contra TALENs para cierto gen (Bortesi y Fischer, 2014).

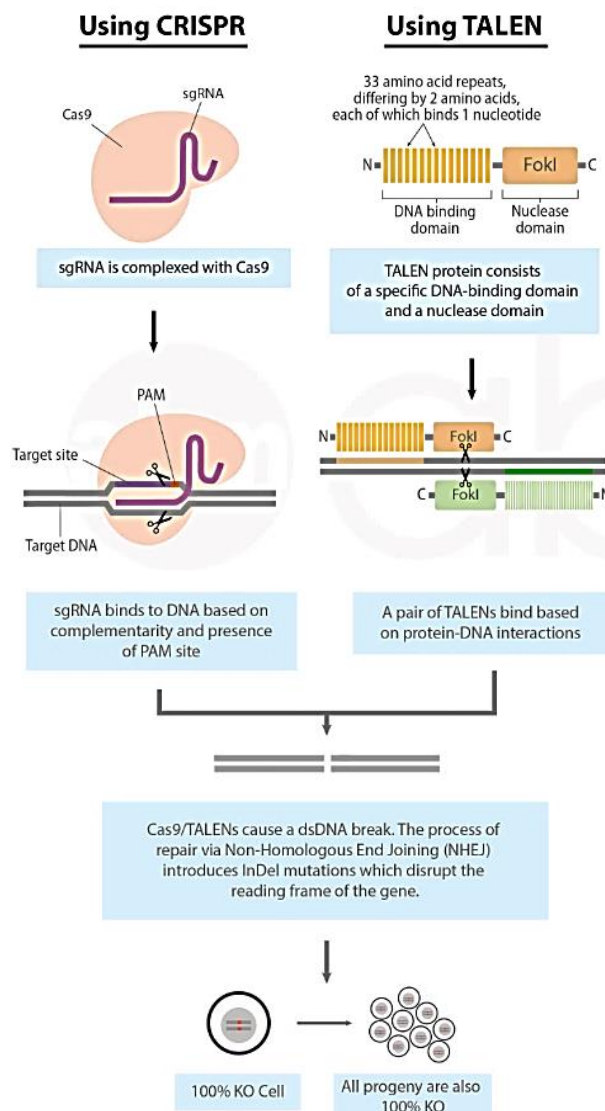


Figura 14. Manipulación genética de genes mediante CRISPR/Cas9 y TALENs (Applied Biological Materials, 2020).

9. Algunas aplicaciones de la tecnología CRISPR/Cas9 desarrolladas en plantas.

El crecimiento de la población humana ha incrementado junto a la demanda de recursos naturales, por lo que ha sido necesario adaptar mejores prácticas que garanticen la producción sustentable optando por tecnologías más eficientes, pero más allá de mejorar la producción, se busca también contribuir a la reducción de pesticidas y agroquímicos que impactan negativamente al medio ambiente (Pixley *et al.*, 2019). Se estima que para el año 2050, la población humana del mundo alcanzará 9.6 billones, e inminentemente la demanda de cultivos básicos incrementará. La tecnología CRISPR/Cas9 ha demostrado ser una tecnología prometedora para desarrollar mejoras genéticas en un lapso corto de tiempo en muchas especies vegetales, mediante la eliminación de elementos genéticos negativos, relacionados a rasgos indeseables, o mutaciones específicas para mejorar el rendimiento, calidad, resistencia a enfermedades y herbicidas (Zhu *et al.*, 2020).

Desde el anuncio de la aplicación de la tecnología CRISPR/Cas9, se han logrado grandes avances en el mejoramiento genético de plantas. Las primeras aplicaciones de CRISPR/Cas9 en plantas fueron reportadas en el año 2013 en especies como *Oryza sativa*, *Triticum* spp., *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana benthamiana* (Murai, 2017).

En cuestión de estrés abiótico, la sequía y las nuevas condiciones ambientales están jugando un papel importante. En muchos cultivos de importancia económica la sensibilidad a la sequía es muy alta, por lo que algunas líneas de investigación se han enfocado en estudiar esta característica, como en el caso del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*); donde utilizando CRISPR/Cas9 se desarrollaron plantas mutantes del gen NPR1, con el fin de evaluar las respuestas a estrés por sequía. El gen NPR1 es considerado importante en la adquisición de resistencia sistémica. Los resultados indicaron que con la desactivación del gen SINPR1 las plantas mutantes presentan la reducción de la tolerancia a la sequía, sugiriendo a NPR1 como un candidato que confiere resistencia ante estrés hídrico (Li *et al.*, 2019).

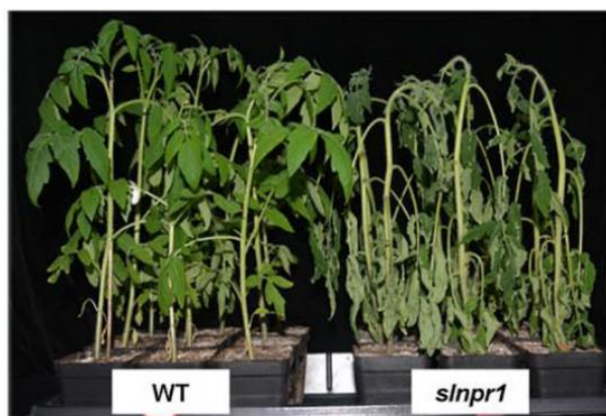


Figura 15. Estrés por sequía en plantas testigo y mutantes del gen *slnpr1* en *Solanum lycopersicum* (Li *et al.*, 2019).

En otras líneas de investigación se ha utilizado a CRISPR/Cas9 para estudiar la resistencia de plantas ante herbicidas; como el caso del gen acetolactato sintasa (ALS) en sandía. En un estudio se generaron líneas de plantas mutantes de sandía del gen ALS con una eficiencia de 23% de transformación. En este estudio se demostró que las plantas mutantes generadas eran resistentes ante el herbicida Tribenuron a diferencia de las plantas testigo (Tian *et al.*, 2018).

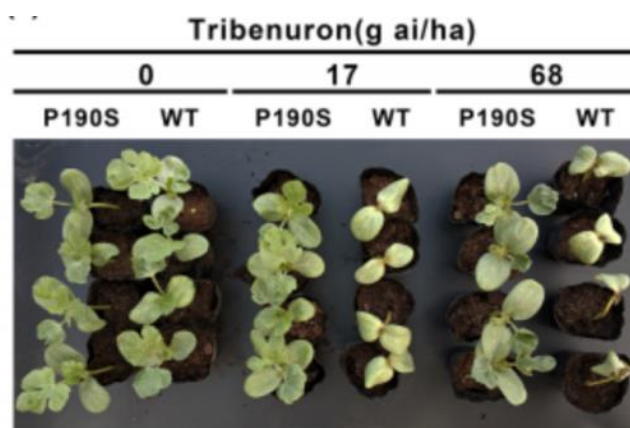


Figura 16. Plantas testigo y mutantes del gen ALS en sandía con aplicación de producto químico Tribenuron a los 17 y 68 días (Tian *et al.*, 2018).

Una estrategia importante ha sido el enfoque en genes de susceptibilidad que favorecen la compatibilidad planta patógeno (Concepción-Hernández, 2018), donde se está aplicando a la tecnología CRISPR para estudiar enfermedades que presentan especies de importancia económica. Un ejemplo lo ha sido con la enfermedad de cancro de los cítricos, que se expresa mediante la activación de un gen susceptible (CsLOB1) a *Xanthomonas citri*. En un ensayo donde se interrumpió el promotor de CsLOB1 mediante CRISPR/Cas9, se generaron líneas que mostraron resistencia a la enfermedad de cancro (Peng *et al.*, 2017).

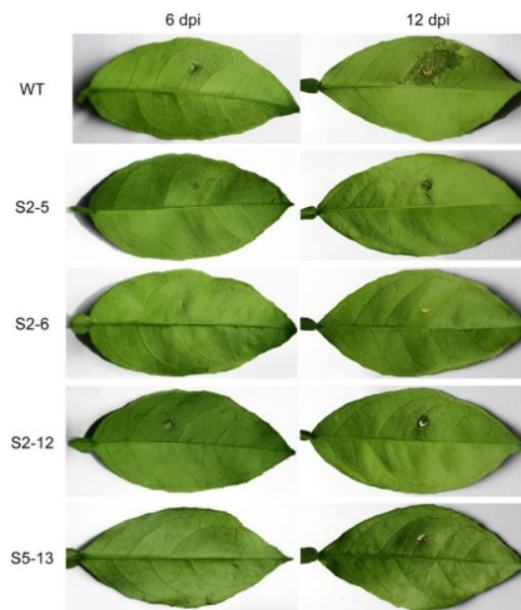


Figura 17. Hojas de plantas testigo y mutantes de *Citrus sinensis* a los 6 y 12 días después de inoculación con *Xanthomonas citri* (Peng *et al.*, 2017).

Otro género de importancia económica como lo es *Coffea*, presenta problemas de estrés biótico, para lo cual se han llevado estudios aplicando la tecnología CRISPR/Cas9 con el objetivo de realizar mejoramiento genético y obtener variedades resistentes. Para el caso de especies leñosas, el desarrollo de mejoramiento genético de manera tradicional conlleva el mismo tiempo que el desarrollo de la planta, por lo que se ha optado por tecnologías rápidas como CRISPR para acelerar este proceso. En la especie *Coffea canephora* el programa de mejoramiento se ha logrado desarrollar en 6 años (Breitler *et al.*, 2018).

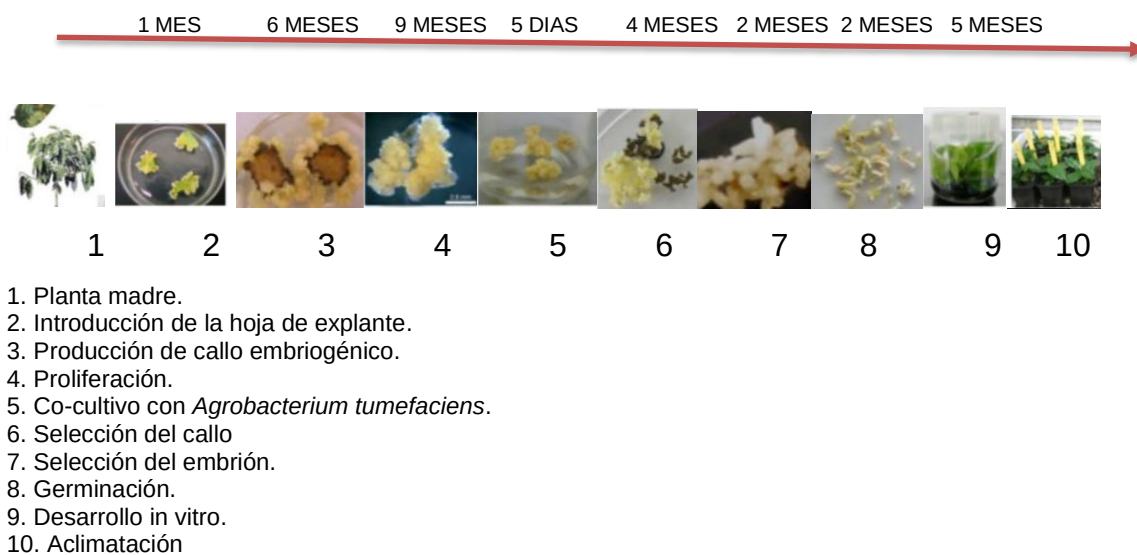


Figura 18. Tiempos de desarrollo del protocolo para generar plantas mutantes en *Coffea* spp (Breitler *et al.*, 2018).

En otras especies leñosas, con el mismo fin de desarrollar nuevos protocolos de mejoramiento genético, se han generado plantas mutantes del gen PDS de *Malus domestica* utilizando CRISPR/Cas9. En este ensayo se obtuvieron el 13.6% de plantas con fenotipo albino, las cuales fueron generadas en un periodo de 8 meses (Nishitani *et al.*, 2016).



Figura 19. Demostración de brotes albinos de *Malus domestica* (Nishitani *et al.*, 2016).

Con el protocolo exitoso de transformación en *Malus* spp., también se llevaron a cabo estudios con *Pyrus* spp. En un ensayo se mutó mediante CRISPR/Cas9 a un gen represor de floración (Terminal flower 1TFL1), donde se observó un fenotipo temprano de floración con el 9% de las plantas mutantes (Charrier *et al.*, 2019).

10. Algunas aplicaciones de la tecnología CRISPR/Cas9 desarrolladas en forestales.

En el sector forestal los estudios del genoma de especies forestales se han llevado a cabo en pocos países que han apostado por esta estrategia. A pesar de ello se han desarrollado importantes avances. Una de las estrategias ha sido la modificación de las características físicas y químicas de la madera para la producción de biomasa sustentable (Ragauskas *et al.*, 2006).

Para poder desarrollar el mejoramiento de las características de la madera, ha sido importante el estudio de los elementos que lo conforman; donde la lignina es un elemento importante. La lignina es un polisacárido que conforma de un 16 a un 32% de la biomasa total de la madera, el cual debe eliminarse para la obtención de pasta de papel (Allona, 2019).

En un estudio mediante la mutación de 4-coumarato:CoA ligasa(4CL) con CRISPR/Cas9 se obtuvo un decrecimiento de lignina y proantocianidina, lográndose en efecto un importante avance en el mejoramiento de la madera (Bewg *et al.*, 2018).

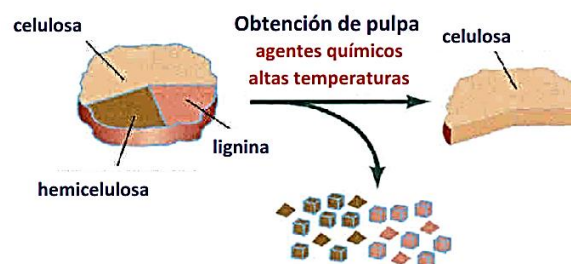


Figura 20. Extracción de celulosa (Allona, 2019).

Otro enfoque importante en el mejoramiento genético de forestales ha sido el estudio de genes relacionados con la arquitectura del árbol. Para tal caso se ha utilizado CRISPR/Cas9 para mutar los genes de BRANCHED 1(BRC1) Y BRANCHED 2(BRC2) en plantas de *Populus* spp.; donde las plantas mutantes mostraron mejora en el crecimiento de las yemas y además presentaron 2 hojas laterales en cada nodo (Muhr *et al.*, 2018).

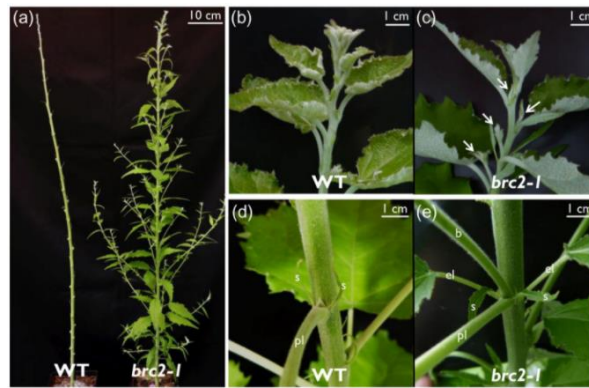


Figura 21. Plantas mutantes del gen BRC2 en *Populus* spp. (Muhr *et al.*, 2018).

En Japón, están trabajando con *Cryptomeria japonica*, donde se ha aplicado CRISPR/Cas9 para mutar 2 genes. En este estudio se desactivó el gen exógeno de fluorescencia (GFP) y se interrumpió el gen endógeno CjChII, donde los resultados obtenidos mostraron que el sistema CRISPR/Cas9 es eficiente en la edición genómica de *Cryptomeria japonica* (Nanasato *et al.*, 2021).

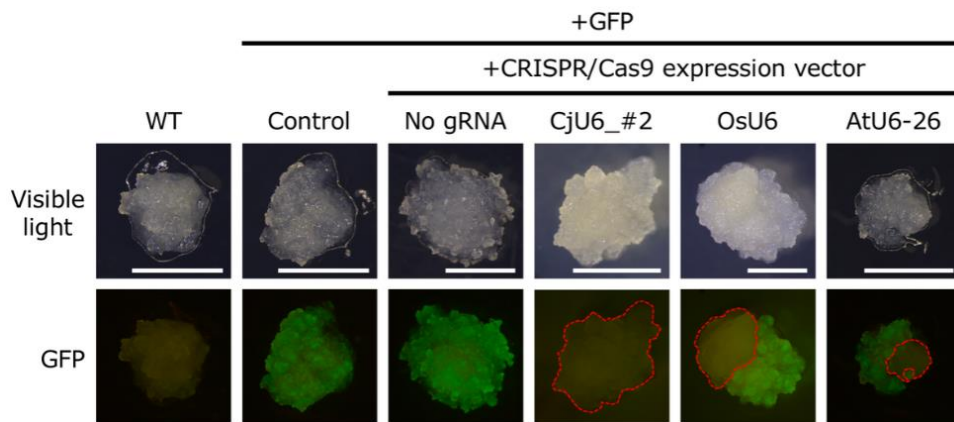


Figura 22. Mutación del gen GFP en tejidos embrionarios de *Cryptomeria japonica* (Nanasato *et al.*, 2021).

En otros países, una de las coníferas que se ha estudiado es *Pinus radiata* por ser la especie comercial más plantada extensivamente en el mundo, debido a su uso para extracción de madera. Se han desarrollado estudios aplicando CRISPR/Cas9 en esta especie para editar el gen GUX1 (glucuronic acid substitution of the xylan 1), donde se generaron delecciones bialélicas con una eficiencia del 15% (Poovaiah *et al.*, 2020).

En especies leñosas tropicales, también se está aplicando a la tecnología CRISPR/Cas9 en la especie *Parasponia andersonii*; la cual está catalogada como una planta de rápido crecimiento, además de que cuenta con la característica de fijar nitrógeno mediante simbiosis con la bacteria *Rhizobium* spp. por medio de nódulos. En este estudio se utilizó CRISPR/Cas9 para mutar exitosamente 4 genes asociados a la simbiosis, donde las plantas mutantes se obtuvieron en 3 meses (Van-Zeijl *et al.*, 2018).

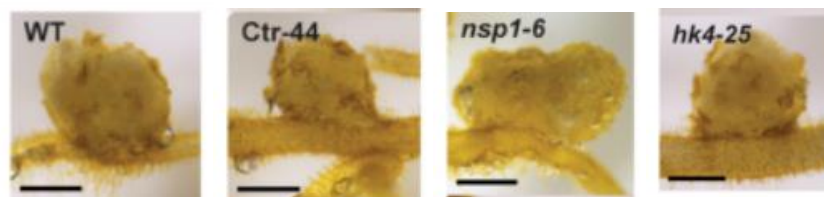


Figura 23. Nódulos en plantas testigo y plantas mutantes de *Parasponia andersonii* (Van-Zeijl *et al.*, 2018).

En otras especies leñosas como *Populus* se ha aplicado CRISPR/Cas9 para mutar un gen que regula la expresión floral; el gen LEAFY (LFY). El resultado de este experimento fue la generación de árboles femeninos con flores estériles y aparente crecimiento normal en campo (Elorriaga *et al.*, 2018).

11. Organismos genéticamente editados (GE) y Organismos genéticamente modificados (GMO).

Anteriormente se ha descrito el mecanismo de la tecnología CRISPR/Cas9 para llevar a cabo la manipulación del genoma en organismos, mediante el cual se han logrado avances importantes de mejoramiento genético en muchas especies vegetales; donde muchas veces se ha citado al producto de esta tecnología como un organismo genéticamente editado (GE), que de acuerdo a algunos autores difiere de los organismos genéticamente modificados (GMO).

De acuerdo a la Secretaría de Servicios Parlamentarios de México, en la Ley de bioseguridad de organismos genéticamente modificados”, actualizado el 11 de noviembre del 2020; en el artículo 3, fracción XXI, y a la Secretaría del convenio

Sobre la Diversidad Biológica, en el Protocolo de Cartagena sobre seguridad de la biotecnología, del convenio sobre la diversidad biológica, firmado en el año 2000; en el artículo 3, inciso “g”, definen a un organismo genéticamente modificado como “cualquier organismo vivo, con excepción de los seres humanos, que ha adquirido una combinación genética novedosa, generada a través del uso específico de técnicas de la biotecnología moderna..”.

Entonces, analizando el concepto anterior, un organismo editado a nivel gen o genoma con CRISPR/Cas9, no deberían considerarse GMO de acuerdo a ese concepto (Khatodia *et al.*, 2016), ya que no se les ha introducido un DNA foráneo, como es el caso de los GMO que si cuentan con material genético foráneo (Murai, 2017). Sin embargo el desarrollo versátil de la tecnología CRISPR/Cas9, plantea regulaciones legales nacionales e internacionales, sobre la seguridad biológica y ecológica frente al abuso de esta tecnología, sin restringir los avances que garanticen la seguridad alimentaria (Medvedieva y Blume, 2018).

Recientemente, se sigue debatiendo la legislación que deberán tener los organismos genéticamente editados en todo el mundo, por las implicaciones que tiene esta tecnología éticamente. En muchos países la regulación no está dictada aun oficialmente (Fernández i Martí y Dodd, 2018).

En el año 2015, los científicos que propusieron las aplicaciones de CRISPR/Cas9, publicaron dos manifiestos acerca de las implicaciones de la tecnología, donde se subraya la necesidad de establecer un amplio diálogo y las fronteras éticas. En dichos manifiestos se relatan recomendaciones respecto al uso de la tecnología, así como también la promoción de la transparencia de sus aplicaciones en los organismos, y como punto importante convocar a representantes para tratar los temas de la gobernanza mundial respecto a la investigación y uso del CRISPR-Cas9 (Bellver-Capella, 2016).

En el caso de la Unión Europea hasta el año 2015 no presentaba postura clara de la regulación de los organismos GE, sino hasta el año 2018, se notificó por parte de la corte de Unión Europea, la postura de que los productos de la

tecnología CRISPR/Cas9 son GMO, y que deben cumplir con la regulación vigente para su liberación (González-Torres, 2018).

En julio del año 2015 E.U.A. inició la revisión de sus regulaciones federales de la biotecnología agrícola (González-Torres, 2018), y para el año 2016 el USDA indicó, que las plantas editadas genéticamente sin un DNA foráneo, no son consideradas como GMO (Murai, 2017), por lo que para marzo del 2018 determinó que la desactivación de genes o la mutación mediante la edición genómica no serían regulados (Pixley *et al.*, 2019).

En agosto del año 2018 el gobierno japonés tomó postura de que las plantas editadas genéticamente sin nucleótidos foráneos no deberían ser reguladas. Mientras que en China, de acuerdo a sus investigaciones, sugiere una postura a favor de los cultivos editados genéticamente (Pixley *et al.*, 2019).

En varios países de América Latina aún no se ha iniciado el análisis regulatorio de la tecnología CRISPR/Cas9. Desde el año 2015, en México únicamente se han llevado seminarios relacionados al tema donde han participado instituciones e investigadores importantes, pero hasta la fecha no hay postura oficial y únicamente se han desarrollado discusiones con fines de divulgación (González-Torres, 2018).

VI. Análisis de resultados y Discusión.

Importancia de los bosques.

Como se ha revisado, la importancia de los bosques es inmensa por los muchos beneficios que proveen, respecto al mantenimiento y buen funcionamiento de diversos sistemas y procesos. De ellos se obtienen recursos naturales que los seres vivos requieren para su subsistencia; favorecen el flujo de los sistemas hídricos, protegen a los suelos de diversos tipos de erosión, contribuyen a la captación de elementos que permiten la obtención de recursos vitales limpios, intervienen significativamente en la mitigación de los efectos de cambio climático, mediante la reducción de gases de efecto invernadero; entonces es de vital importancia apostar por tecnologías que amplíen los estudios en genómica forestal con el fin de generar especies resistentes a condiciones donde no podrían prosperar de manera natural.

Cambios negativos en superficie forestal mundial.

Evidentemente los bosques del planeta son de vital importancia, sin embargo, en los últimos años han presentado un decrecimiento en su superficie, sin lugar a duda, por diversos factores naturales y antropogénicos. En estadísticas de la evaluación mundial de los bosques publicadas por la FAO en el año 2021, en el periodo del año 1990 al año 2021, ha ocurrido una disminución del 3.2% de superficie mundial de bosque, lo que equivale a 129,135,000 de ha de bosque perdido. Esta cifra es inquietante por el valor invaluable que poseen los bosques, ya que evidentemente en esa superficie perdida, han quedado descubiertos distintos sistemas, como por ejemplo el suelo, hábitats de seres vivos y también se han perdido los servicios ambientales que se obtenían de ellos, lo cual ha repercutido en muchos procesos ecológicos y sin duda ha contribuido al calentamiento global. Por otro lado, no hay que ignorar el hecho de que los recursos forestales que se extraen de los bosques, proporcionan insumos y materia prima como madera y otros biocombustibles, que permiten el desarrollo de la humanidad; que sin duda alguna, su regulación para su extracción y

reforestación es de vital importancia, para con ello poder seguir extrayendo estos recursos de manera sostenible y al mismo tiempo mantener territorios reforestados que contribuyan con los servicios ambientales que proveen.

Cambios negativos en superficie forestal de México.

México presenta actualmente el 2.1% de superficie forestal mundial, donde alberga diversos ecosistemas naturales que son de vital importancia para el país. En efecto estos ecosistemas en el país como en todo el mundo, han presentado una reducción de su superficie a lo largo del tiempo. Se estima que del año 1970 al año 2014 se han perdido más de 23,000,000 ha de selva y más de 13,000,000 ha de bosque. Como se ha revisado, los bosques intervienen en diversos procesos ecológicos y además ayudan a mitigar los gases de efecto invernadero, por lo que es crucial y necesario desarrollar programas de mejoramiento genético que garanticen la adaptación y subsistencia de especies forestales resistentes ante las nuevas condiciones ambientales.

Es cierto que, para intervenir en el sector forestal en México, son diversas las problemáticas que se tendrían que abarcar; al menos para el país, son muchos los temas, desde socioeconómicos, políticos y culturales; es evidente que hay mucho trabajo por hacer, pero para ello, se podría ir desglosando cada problemática por área de estudio correspondiente. Al menos en el ámbito de mejoramiento genético, se podría optar por tecnologías eficientes y que permitan desarrollar estudios en un lapso menor de tiempo.

Tierras secas en México y el mundo.

Un punto importante que no se debería ignorar, es la consecuencia de la pérdida de arbolado que protege a varios ecosistemas; uno muy importante como lo es el suelo, ya que, debido a la falta de vegetación arbórea, se vuelve susceptible a diversos tipos de erosión, favoreciendo a la formación de mayor superficie de tierras secas. Las condiciones propias de las tierras secas, dificultan el desarrollo y la subsistencia de varios organismos, debido al índice de aridez que presentan, temperaturas extremas y bajos recursos hídricos, por lo que es necesario aplicar

tecnologías, que permitan desarrollar estudios, para mejorar especies forestales resistentes ante estas condiciones de estrés abiótico, que garanticen su adaptación y supervivencia en estos territorios.

En México las tierras secas ocupan el 65% del territorio nacional, lo que indica que hay más territorio con índice de aridez que superficie forestal. El territorio correspondiente de estas zonas es de más de 125 millones de ha, en efecto, es un territorio inmenso, mismo que podría ser reforestado con especies forestales que presenten rasgos adaptativos a las condiciones propias de la zona, lo cual podría ser posible mediante la aplicación de tecnologías moleculares como lo es CRISPR/Cas9.

Ciertamente se han realizado programas de reforestación, pero del total de la zona afectada solo se ha atendido una mínima parte, esto indica que aún falta mucho más territorio por atender, y si en ese proceso se reforesta con especies mejoradas, se estará garantizando la subsistencia y fácil adaptación de las mismas en estas condiciones desfavorables, además, se podrá proteger a los suelos y evitar la generación de más suelos erosionados y tierras secas, sin mencionar los grandes beneficios que se estarían obteniendo al haber mayor biomasa forestal en el país.

Tecnología CRISPR/Cas9.

A lo largo del documento se han mencionado las aportaciones del sistema CRISPR/cas9, las cuales han revolucionado el mundo de la ciencia. Esta tecnología, se adaptó del sistema inmune de bacterias, para realizar incisiones en el DNA, donde, el éxito de las mutaciones de células eucariotas ha funcionado gracias a las vías de reparación propias de estas células. En efecto, la tecnología CRISPR/Cas9, brinda grandes posibilidades para desarrollar mejoras en diversos organismos, además de desarrollar diversos estudios, para la comprensión de las rutas metabólicas en muchos genes, relacionados a rasgos adaptativos; sin lugar a dudas, la tecnología CRISPR/Cas9 representa una gran herramienta y oportunidad para el sector forestal del país, con el cual se podrían

lograr grandes avances y dar solución a problemas bióticos y abióticos mediante la generación de especies resistentes.

CRISPR/Cas9 con otras tecnologías de edición genómica: ZFNs y TALENs.

Ciertamente CRISPR/Cas9 no es la única tecnología que se ha aplicado para la edición del genoma; anteriormente se han utilizado tecnologías como TALENs y ZFNs, las cuales, también cuentan con nucleasas dirigidas a secuencias específicas para editar o manipular a un gen. Sin embargo, se tiene que mediar el costo, el tiempo y eficiencia al momento de considerar cual tecnología aplicar. Respecto a eficiencia de transformación, muchos investigadores han demostrado que CRISPR/Cas9, ha sido más eficiente a diferencia de TALENs Y ZFNs, y además se argumenta que estas son más costosas por el tipo de reactivos y materiales que se emplean, y el tiempo para construir los protocolos para localizar una secuencia es mayor. En evidencia, desde el anuncio de la aplicación del sistema CRISPR, han surgido un sinnúmero de artículos, donde se ha aplicado CRISPR para editar el genoma. Todos estos estudios han demostrado un éxito en la edición de genes, así que sin duda, la utilización de CRISPR/Cas9 puede ser una estrategia prometedora por su mayor eficacia, menor tiempo y menor presupuesto de inversión a diferencia de las otras tecnologías que se han empleado anteriormente.

Algunas aplicaciones de la tecnología CRISPR/Cas9 desarrolladas en plantas.

En tan solo pocos años del descubrimiento del sistema CRISPR/Cas9, la ciencia ha avanzado a pasos gigantes en diversas áreas de estudio con un sinnúmero de aplicaciones. En el área vegetal se han realizado grandes avances en el estudio y la comprensión de muchos genes importantes que confieren resistencia sistémica ante diversos tipos de estrés biótico y abiótico, además, estos logros benefician al medio ambiente mediante la reducción del uso de pesticidas y agroquímicos.

Actualmente ya se han reportado protocolos de transformación en muchos cultivos de importancia económica, los cuales han sido un éxito, como lo ha sido con la desactivación del gen NPR1 en jitomate, donde se encontró que las plantas resultantes presentaron baja tolerancia a estrés hídrico, lo cual sugiere a este gen como importante en la adquisición de resistencia ante estrés por sequía, o el gen ALS en sandía que provee resistencia a las plantas mutantes contra un herbicida, con la desactivación del gen CsLOB1 en naranja las plantas mutantes presentaron resistencia a *Xanthomonas citri*, y con el gen PDS reportado en cultivos como manzana, álamo y café, se obtuvieron plantas albinas debido a la interrupción de la ruta de la síntesis de clorofila en estos cultivos.

Todos estos avances desarrollados exitosamente, sugieren posibles soluciones a problemáticas de estrés biótico y abiótico estudiando a los genes homólogos de especies forestales de interés, lo cual, mediante la tecnología CRISPR/Cas9 como herramienta, se podrían realizar mejoras de manera eficiente y más rápida.

Algunas aplicaciones de la tecnología CRISPR/Cas9 desarrolladas en forestales.

Recientemente, el panorama de la genómica forestal se está ampliando con el apoyo de la tecnología CRISPR/Cas9. En el mundo y en varios países se está aplicando CRISPR/Cas9 para desarrollar investigaciones que permitan una mejor comprensión de la genómica de forestales, con la inactivación y sobreexpresión de genes relacionados a características de interés; donde, posteriormente se pueden desarrollar programas y protocolos, para generar especies forestales resistentes ante condiciones ambientales extremas y con mejores características para producir mayor biomasa vegetal.

Un ejemplo de mejora ha sido con la modificación de las características físicas y químicas de la madera mediante la mutación del gen 4CL para reducir el porcentaje de lignina, o con los genes BRC1 y BRC2 con los cuales se obtuvo mayor producción de biomasa en la especie *Populus* spp; de igual manera, con CRISPR/Cas9 se podrían estudiar las funciones de los genes homólogos de 4CL y BRC en especies forestales producidas en el país, como podrían ser *Pinus* spp o *Quercus* spp. La estrategia que se está empleando con el estudio de simbiosis

de *Rhizobium* con la especie *Parasponia andersonii* es muy prometedora, ya que el nitrógeno es un elemento esencial como componente estructural de ciertas biomoléculas en las plantas y sin lugar a duda comprender el funcionamiento de esta característica particular, podría emplearse en un futuro para dar frente a problemas de baja disponibilidad de formas químicas asimilables del nitrógeno en suelos deteriorados.

Como ya se ha revisado, en el mundo y en México sin excepción, las condiciones ambientales están cambiando; las condiciones son cada vez más extremas, como lo son los ambientes con altas temperaturas, suelos deteriorados, escasez hídrica y el ataque de patógenos. Hay mucho trabajo por hacer y sin duda alguna, los previos avances del mejoramiento vegetal pueden servir de guía para estudiar genes homólogos en especies forestales del país que les confieran mejores características. Como posible estrategia, mediante CRISPR/cas9 se podría estudiar y validar la función del gen homólogo NPR1 en cierta especie forestal de interés, con la finalidad de conferir resistencia ante estrés hídrico, o con el gen homólogo de LOB1 para conferir resistencia ante patógenos como *Xanthomonas* spp.

De la superficie de suelo deteriorado en el país, apenas el 0.2% se ha atendido, además, en promedio, anualmente se ha registrado el ataque de plagas en más de 56,000 ha; como ejemplo dentro de los 70 patógenos reportados esta *Conophthorus edulis* que afecta a áreas de *Pinus pinea* o también *Fusarium circinatum*, causante de la enfermedad de cancro resinoso del pino, entre otras problemáticas más que se citan en el anexo 2, lo cual indica que hay un extenso trabajo por realizar, sin embargo, no hay que ignorar un tema importante, el cual es el flujo genético de la biodiversidad del país; ante un escenario de un establecimiento de una especie forestal mejorada, evidentemente de acuerdo al ciclo natural de reproducción, tendríamos una mezcla de los materiales genéticos endémicos y materiales genéticos modificados, lo cual nos representaría un panorama no deseado para la biodiversidad del país; pero a pesar de ello, es un hecho que también se tiene que intervenir con estrategias para mitigar los efectos de cambio climático, pero sobre todo garantizar la supervivencia de especies forestales ante condiciones extremas, para tal

situación, con la tecnología CRISPR/Cas9 se podría estudiar y validar a genes relacionados a los componentes de reproducción de especies forestales de interés, de esa manera se podrían lograr plantas estériles, que además presenten características genéticas deseables, que a su vez no interfieran con el flujo genético de la biodiversidad del lugar, como en el estudio desarrollado en *Populus*, donde aplicando CRISPR/Cas9 se lograron plantas estériles mediante la mutación del gen LFY. De la misma manera que con el estudio desarrollado con el gen LFY, mediante CRISPR/Cas9 se podría validar y estudiar a genes homólogos en especies forestales de interés relacionados a los componentes de reproducción, con el fin de desarrollar plantas estériles que no interfieran con el flujo genético de la biodiversidad del país.

Organismos genéticamente editados (GE) y Organismos genéticamente modificados (GMO).

Todas las tecnologías moleculares nos han permitido avanzar rápidamente en el mejoramiento genético de muchas especies vegetales, sin embargo, la aplicación de muchas de estas tecnologías incluyendo a la tecnología CRISPR/Cas9 tienen que sujetarse a la regulación de cada país.

La aceptación de la tecnología CRISPR/Cas9 por la sociedad es un factor determinante para su aplicación, ya que el avance de las investigaciones depende de su aprobación y reglamentación. Para el caso particular de CRISPR/Cas9, respecto a los alcances y fronteras, se encuentra en discusión en cada país, de acuerdo a diversas consideraciones; debido a que el producto de la tecnología CRISPR/Cas9 no incluye material genético foráneo, como los GMO, pero el mismo hecho de manipular el genoma de organismos pone en cuestión delimitar y regular los alcances de su aplicación.

En México es justo y necesario poner en discusión la regulación para la aplicación de tecnologías eficientes y rápidas para desarrollar estudios que generen especies forestales mejoradas, y por supuesto son necesarias regulaciones para la tecnología CRISPR/Cas9 distintas a los GMO, debido a que la definición de un GMO no figura con el producto generado por la tecnología

CRISPR/Cas9, sin embargo se tienen que delimitar sus alcances y aplicaciones para su liberación en el ambiente como cualquier otro GMO, y tener documentos guías, que den a conocer los límites y alcances de los experimentos. Habiendo documentos regulatorios podría ser más sencillo avanzar en las investigaciones siguiendo las cuestiones legales o éticas.

VII. Conclusión.

Es un hecho que los bosques son de gran importancia en diversos ciclos y procesos naturales del planeta; además brindan diversos bienes y recursos a la humanidad. En efecto, como se revisó anteriormente, en respuesta a muchos factores naturales y antropogénicos la superficie forestal ha disminuido, y, además, el conjunto de las nuevas condiciones ambientales que ha traído el cambio climático, dificultan la adaptación y subsistencia de las especies forestales, y en respuesta a la falta de biomasa forestal, se ha favorecido al calentamiento global.

En contraste, a la reducción de superficie forestal, debido a la falta de arbolado, se está favoreciendo también a la erosión de los suelos, que a su vez, favorece la formación de mayor superficie de tierras secas, por tal cuestión, se propone desarrollar investigaciones aplicando a la tecnología CRISPR/Cas9 como herramienta para estudiar y validar funciones de genes que confieran resistencia sistémica a estrés biótico y abiótico a las especies forestales del país.

Como estrategia, aplicar a la tecnología CRISPR/Cas9 como herramienta para estudiar a genes homólogos de interés con el fin de conferir resistencia a estrés hídrico, como podría ser el caso del gen NPR1, en especies forestales del país, que podrían cultivarse en zonas áridas.

Se propone aplicar CRISPR/Cas9 como herramienta para estudiar y validar al gen LOB1, con la finalidad de conferir resistencia ante estrés biótico en especies que lo requieran, así como también para estudiar las funciones de los homólogos del gen 4CL para mejorar las características de la madera en especies utilizadas para extracción de celulosa, así mismo para estudiar las funciones del gen BRC2 en las mismas, con la finalidad de lograr mayor biomasa forestal.

Con el fin de resguardar responsablemente a la biodiversidad de las especies forestales endémicas y la importante cuestión de no intervenir con el flujo genético natural, se propone utilizar a CRISPR/Cas9 como herramienta para

estudiar y validar genes relacionados a componentes de reproducción de las especies forestales de interés; como posible candidato al gen LFY, con la finalidad de desarrollar plantas estériles que no intervengan con el flujo genético.

En base a las aplicaciones de CRISPR/Cas9 desarrolladas con éxito, para la transformación genética en especies vegetales, y debido a la disminución de superficie forestal mundial, y a las nuevas condiciones de cambio climático que dificultan la adaptación de las especies forestales, que en consecuencia favorece al calentamiento global; se propone a la tecnología CRISPR/Cas9 como una herramienta para generar especies forestales mejoradas en México.

VIII. BIBLIOGRAFIA.

Allona, I. (2019). Potencial de la biotecnología para mejorar sus características en función de sus usos. "Ingeniería genética de la madera". Biotecnología forestal. Universidad Politécnica de Madrid.

Applied Biological Materials. (2020). Gene Silencing Methods: CRISPR vs. RNAi vs. TALEN. Recuperado el: 16 de Julio 2020, disponible en: https://old.abmgood.com/marketing/knowledge_base/Gene-Silencing-CRISPR-TALEN-RNAi

Bastin, J.F., Berrahmouni, N., Grainger, A., Maniatis, D., Mollicone, D.,...y Castro, R. (2017). The extent of forest in dryland biomes. Science 356 (6338), 635-638. Disponible en: <https://doi.org/10.1126/science.aam6527>

Bellver-Capella, V. (2016). La revolución de la edición genética mediante CRISPR-Cas9 y los desafíos éticos y regulatorios que comporta. Cuadernos de Bioética, vol. XXVII, núm. 2, pp. 223-239. Asociación Española de Bioética y Ética Médica. Madrid, España. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=87546953009>

Bewg, W. P., Ci, D., y Tsai, C. J. (2018). Genome editing in trees: from multiple repair pathways to long-term stability. Frontiers in Plant Science. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01732>

Bortesi, L., and Fischer, R. (2014). The CRISPR /Cas9 system for plant genome editing and beyond. Institute for Molecular Biotechnology, Aachen University, Germany. Biotechnology advances. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.006>

Breitler, J. C., Dechamp, E., Campa, C., Zebrar-Rodrigues. L., Guyot, R. Marraccini, P., Etienne, H. (2018). CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis has the potential to accelerate the domestication of Coffea canephora. Springer. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1429-2>

- Chapela, G., y Merino, P., L. (2019). Hacia una política forestal sustentable e incluyente. Los bosques de México, problemas y propuestas. *En: Crisis ambiental en México. Ruta para el cambio*. Pp. 164-175. Ciudad de México, México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Charrier, A., Vergne, E., Dousset, N., Richer, A., Petiteau, A., y Chevreau, E. (2019). Efficient Targeted Mutagenesis in Apple and First Time Edition of Pear Using the CRISPR-Cas9 System. *Frontiers in Plant Science*. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00040>
- Concepción-Hernández, M. (2018). CRISPR/Cas: Aplicaciones y perspectivas para el mejoramiento genético de plantas. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Cuba. *Biotecnología Vegetal*. Vol. 18, No.3: 135 – 149.
- Davis, A.J. y Chen, D.J. (2013). DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *National institute of health*. Disponible en: <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-676X.2013.04.02>.
- Doudna, J. (2017). CRISPR Basics. *In: 2017 CRISPR Workshop: Practical Aspects of Precision Biology*. Innovative Genomics Institute. University of California Berkley. Recuperado el: 25 de junio del 2020, disponible en: <https://innovativegenomics.org/2017-crispr-workshop-practical-aspects-precision-biology/>
- Elorriaga, E., Klocko, A.L., Ma, C. and Strauss, S.H. (2018). Variation in Mutation Spectra Among CRISPR/Cas9 Mutagenized Poplars. *Frontiers in Plant Science*. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00594>
- FAO (2021). Evaluación de los recursos forestales mundiales 2020. Informe principal. Roma, Italia. Disponible en : <https://doi.org/10.4060/ca9825es>
- Fernandez i Marti, A. y Dodd R.S. (2018). Using CRISPR as a Gene Editing tool for Validating Adaptive Gene Function in Tree Landscape Genomics. *Front. Ecol. Evol.* 6:76. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fevo.2018.00076>.

- González-Torres, R. I. (2018). Entre el ser o no ser OGMs: edición genómica mediante CRISPR-Cas9, regulación y mejoramiento genético en plantas, la redefinición del concepto de organismo genéticamente modificado. Tesis de doctorado en Sociología. Universidad Autónoma Metropolitana (México).
- Hui, L., Chang, L., Zhao, Y. H., Han, X. J., Zhou, Z. W., Chen, W., ... y Xue-ling, L. (2018). Comparing successful gene knock-in efficiencies of CRISPR/Cas9 with ZFNs and TALENs gene editing systems in bovine and dairy goat fetal fibroblasts. *Journal of integrative agriculture*, 17(2), 406-414. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61748-9](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61748-9)
- Jiang, F., y Doudna, J. A. (2017). CRISPR–Cas9 structures and mechanisms. *Annual Review of Biophysics*, 46, 505-529. Disponible en: <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-010822>
- Khatodia, S., Bhatotia, K., Passricha, N., Khurana, S.M.P. y Tuteja, N. (2016). The CRISPR/Cas Genome-Editing Tool: Application in Improvement of Crops. *Plant Science*. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00506>
- Li, R., Liu, C., Zhao, R., Wang, L., Chen, L., Yu, W., Zhang, S., Sheng, J., and Shen, L. (2019). CRISPR/Cas9-Mediated SINPR1 mutagenesis reduces tomato plant drought tolerance. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing, China. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1627-4>
- MacDicken, K., Jonsson, O., Piña, L., Maulo, S., Contessa, V., Adikari, Y.,...y D'Annunzio, R. (2016). Evaluación de los recursos forestales mundiales 2015. ¿Cómo están cambiando los bosques del mundo?. Segunda edición. Roma, Italia: FAO.
- Medvedieva, M.O and Blume, Y. B. (2018). Legal Regulation of Plant Genome Editing with the CRISPR/Cas9 Technology as an Example. Institute of International Relations of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine. Institute of Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine. Disponible en: <https://doi.org/10.3103/S0095452718030106>

- Mohanraju, P., Makarova, K.S., Zetsche, B., Zhang, F., Koonin, E.V., van der Oost, J. (2016). Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems. Disponible en: <https://doi.org/10.1126/science.aad5147>
- Mojica, F. J., y Garrett, R. A. (2013). Discovery and Seminal Developments in the CRISPR Field. In: CRISPR/Cas Systems. RNA-Mediated Adaptive Immunity in Bacteria and Archaea. Barrangou, R. and van der Oost, J., (eds). Springer Heidelberg New York Dordrecht, London. 2-4. Pp.
- Muhr M., Paulat, M., Awwanah, M., Brinkkötter, M., Teichmann, M. (2018). CRISPR/Cas9-mediated knockout of *Populus* BRANCHED1 and BRANCHED2 orthologs reveals a major function in bud outgrowth control. Department of Plant Cell Biology, Albrecht-von-Haller-Institute for Plant Sciences, Georg-August-University, Göttingen, Germany. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/treephys/tpy088>
- Murai, N. (2017). Review: Plant Genome Editing Targeted by RNA-Guided DNA Endonuclease CRISPR/ Cas9. American Journal of Plant Sciences, 8, 3460-3474. Disponible en: <https://doi.org/10.4236/ajps.2017.813233>
- Nanasato, Y., Mikami, M., Futamura, N., Endo, M., Nishiguchi, M., Ohmiya, Y., Konogaya, K., Taniguchi, T. (2021). CRISPR/Cas9-mediated Targeted Mutagenesis in Japanese Cedar (*Cryptomeria japonica* D. Don). Scientific reports. Research square. Disponible en: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-275612/v1>
- Nishitani, C., Hirai, N., Komori, S., Wada, M., Okada, K., Osakabe, K., Yamamoto, T., Osakabe, Y. (2016). Efficient Genome Editing in Apple Using a CRISPR/Cas9 system. Nature. Scientific Reports. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/srep31481>
- Patriarca, C., Bako, M., Branthomme, A., Frescino, T.S., Haddad, F.F., Hamid, A. H.,...y Ziadat, F. (2019). Trees, forests and land use in drylands. The first global assessment. Preliminary findings. Rome, Italy: FAO.

- Peng, A., Chen, S., Lei, T., Xu, L., He, Y., Wu, L., ... y Zou, X. (2017). Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene Cs LOB 1 promoter in citrus. *Plant biotechnology journal*, 15(12), 1509-1519.
- Pixley, K. V., Falck-Zepeda, J. B., Giller, K. E., Glenna, L. L., Gould, F., Mallory-Smith, C. A., Stelly, D. M. y Stewart Jr., C. N. (2019). Genome Editing, Gene Drives, and Synthetic Biology: Will They Contribute to Disease-Resistant Crops, and Who Will Benefit?. *Annual Review of Phytopathology*, 57, 165-188. Disponible en: <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-045954>
- Poovaiah, C., Phillips, L., Geddes, B., Reeves, C., Sorieul, M., Thorlby, G. (2020). Genome Editing With CRISPR/Cas9 in *Pinus Radiata* (D. Don). *Research square. BMC Plant biology. BMC series*. Disponible en: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-117877/v1>
- Ragauskas, A.J., William, C.K., Davison, B.H., Britovsek, G., Cairney, J., Eckeert, C.A.,,,,,,y Tschaplinski, T. (2006). The Path Forward for Biofuels and Biomaterials. *Science* vol.311. 484,489 pp. Disponible en: <https://doi.org/10.1126/science.1114736>
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., y Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols*, 8(11), 2281. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
- Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica. (2000). Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica: texto y anexos. Montreal, Canadá.
- Secretaria de Servicios Parlamentarios (2020). Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados.Última Reforma D.O.F. 06 de noviembre del 2020. Ciudad de México, México.

SEMARNAT (2019). Informe de la situación del medio ambiente en México 2018. Compendio de estadísticas ambientales. Indicadores clave, de desempeño ambiental y de crecimiento verde. Ciudad de México, México.

Tian, S., Jiang, L., Cui, X., Zhang, J., Guo, S., Li, M., Zhang, H., Ren, Y., Gong, G., Zong, M., Liu, F., Chen, Q., and Xu, Y. (2018). Engineering herbicide-resistant watermelon variety through CRISPR/Cas9-mediated base-editing. Springer-Verlag, Germany, part of Springer Nature 2018. *Plant Cell Reports* (2018) 37:1353–1356. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2299-0>.

Van-Zeijl, A., Wardhani, T. A. K., Seifi-Kalhor, M., Rutten, I., Bu, f., Hartog, M., Linders, S., Fedorova, E. E., Bisseling, ., Kohlen, W., and Geurts, R. (2018). CRISPR/Cas9-Mediated Mutagenesis of Four Putative Symbiosis Genes of the Tropical Tree *Parasponia andersonii* Reveals Novel Phenotypes. Laboratory of Molecular Biology, Department of Plant Sciences, Wageningen University and Research, Wageningen, Netherlands. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00284>

Zhu, H., Li, C., Gao, C. (2020). Applications of CRISPR–Cas in agriculture and plant biotechnology. State Key Laboratory of Plant Cell and Chromosome Engineering, Center for Genome Editing, Institute of Genetics and developmental Biology, Innovation Academy for Seed Design, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China. College of Advanced Agricultural Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, China. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00288-9>

IX. ANEXOS.

ANEXO 1. ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS.

ALS: Gen acetolactato sintasa

BRC1: Gen BRANCHED 1

BRC2: Gen BRANCHED 2

Cas (CRISPR-associated): genes ó proteínas asociados a CRISPR.

Cas1(CRISPR-Associated 1): gen ó proteína 1 asociada a CRISPR.

Cas2 (CRISPR-Associated 2) : gen ó proteína 2 asociada a CRISPR.

CjChII: Gen subunidad 1 de quelatasa de *Cryptomeria japonica*.

crRNA: Secuencia RNA de CRISPR maduro.

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats): secuencias palindrómicas cortas repetidas regularmente interespaciadas.

CRISPR-Cas: secuencias palindrómicas cortas repetidas regularmente interespaciadas asociadas a nucleasas Cas.

CRISPR/Cas9: secuencias palindrómicas cortas repetidas regularmente interespaciadas asociadas a la nucleasa Cas9.

CO₂: Dióxido de carbono.

CsLOB1: gen límites de órganos laterales de *Citrus sinensis*.

DNA: (Deoxyribonucleic acid): Ácido desoxirribonucleico.

DSB (Double-Strand Break): doble corte en la cadena.

GUX1: (Glucuronic acid substitution of the xilan 1) Gen Sustitución de ácido glucurónico del xilan 1

FAO (Food agriculture organization): Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura.

FRA (Forest resources assessment): Evaluación de los recursos forestales mundiales.

GE: (Genetically edited) Editado genéticamente.

GMO: (Genetically modified organism) Organismo genéticamente modificado.

Gt: Gigatonelada unidad de masa equivalente a 1000 millones de toneladas métricas.

GTT : Secuencia PAM conformada por guanina-timina-timina.

GFP: (Green fluorescent protein) Gen de la proteína fluorescente verde.

Ha: Hectárea

HDR (Homology-Directed Repair): Recombinación homóloga directa.

HNH: dominio nucleasa de Cas9 que escinde la cadena complementaria al crARN.

IA: índice de aridez

KD: (Knock down) Reducción de la expresión de un gen.

KI(Knock in): técnica de substitución de secuencias por otro o modificada en un locus.

KO(Knock out) anulación o bloqueo, elimina la expresión de la proteína del gen.

nCas9 (Nickase 9): Cas9 mutada para que solo escinda una hebra de DNA.

NGG: Secuencia PAM conformada por un nucleótido"x"-guanina-guanina.

NHEJ: (Non-Homologous End Joining) Recombinación no homóloga.

NPR1: (Nonexpressor of pathogenesis-related gene 1). Gen 1 relacionado a no expresión de patogénesis.

LFY: Gen LEAFY

LOB1 (Lateral organ boundaries 1): Límites laterales del órgano 1.

PAM (Protospacer Adjacent Motif): Secuencia corta adyacente al protoespaciador.

PanEIN2: Gen etileno insensible 2 de *Parasponia andersonii*.

PanHK4: Gen histidina quinasa 4 de *Parasponia andersonii*.

PanNSP1: Gen ruta señalizador de nódulos 1 de *Parasponia andersonii*.

PanNSP2: Gen ruta señalizador de nódulos 1 de *Parasponia andersonii*.

PDS (Phytoene desaturase) : gen fitoeno desaturasa.

PIB: Producto interno bruto

PPCC: pérdida parcial de cobertura de copas.

pre-crARN: precursor del cr-ARN.

RNA (Ribonucleic acid): Ácido ribonucleico.

RuvC: dominio nucleasa de Cas9 que escinde la cadena complementaria al crARN.

SaCas9: *Staphylococcus aureus* Cas9.

SEMARNAT: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

sgARN: ARN guía utilizado en sistemas CRISPR-Cas9.

SINPR1: (*Solanum lycopersicum* Nonexpressor of pathogenesis-related gene 1). Gen 1 relacionado a no expresión de patogénesis de *Solanum lycopersicum*.

SpCas9: *Streptococcus pyogenes* Cas9.

TALENs (Transcription Activator Like Effector Nucleases): nucleasas tipo activadores de transcripción.

TFL1: (Terminal flower 1) gen flor terminal 1

tracr-RNA: RNA transactivador.

Xcc : *Xanthomonas citri*.

USD: Dólar estadounidense.

ZFNs (Zinc Finger Nucleases): nucleasas de dedos de zinc.

4CL (4-Coumarate:CoA ligase): gen 4-Coumarato ligasa.

ANEXO 2. PRINCIPALES PATÓGENOS QUE AFECTAN A FORESTALES DE IMPORTANCIA ECONÓMICA EN MÉXICO (SEMARNAT, 2019).

Patógeno	Tipo de vegetación afectada en México
<i>Antiteuchus piceus</i>	Bosque de pino-encino.
<i>Apogonalia mediolineata</i>	Bosques templados.
<i>Arceuthobium globosum</i>	Bosques templados.
<i>Arceuthobium blumeri</i>	Bosques templados.
<i>Arceuthobium strictum</i>	Bosques templados.
<i>Arceuthobium vaginatum</i>	Bosques templados.
<i>Atta</i> spp	Plantaciones forestales.
<i>Chrysobothris</i> spp	Plantaciones forestales.
<i>Chrysobothris yucatanensis</i>	Plantaciones forestales.
<i>Cladocolea</i> spp	Bosque de pino-encino.
<i>Conophthorus edulis</i>	Áreas de pino piñonero.
<i>Cronartium quercum</i>	Bosques templados.
<i>Cryptostegia grandiflora</i>	Bosques templados.
<i>Cydia</i> spp	Bosques templados.
<i>Dendroctonus adjunctus</i>	Bosques templados.
<i>Dendroctonus frontalis</i>	Bosques templados.
<i>Dendroctonus mexicanus</i>	Bosques templados.
<i>Dendroctonus pseudotsugae</i>	Bosques templados.
<i>Dendroctonus rhizophagus</i>	Bosques templados en regeneración.
<i>Diabrotica</i> spp	Bosques templados.
<i>Eulepte gastralis</i>	Plantaciones forestales.
<i>Fusarium circinatum</i>	Bosques templados.
<i>Hemiceras</i> spp	Bosques templados.
<i>Hyblaea puera</i>	Selva baja y media.
<i>Hypsipyla grandella</i>	Plantaciones forestales.
<i>Ips caligraphus</i>	Bosques templados.
<i>Ips</i> spp	Bosques templados.
<i>Malacosoma</i> spp	Vegetación urbana y plantaciones forestales.
<i>Neodiprion autumnalis</i>	Bosque de pino-encino.
<i>Neodiprion bicolor</i>	Bosques templados.
<i>Neodiprion</i> spp	Bosques templados.
<i>Olivea tectonae</i>	Plantaciones forestales.
<i>Paranthrene dollii</i>	Vegetación urbana y plantaciones forestales.
<i>Phoradendron bolleanum</i>	Bosques templados.
<i>Phoradendron galeotti</i>	Bosque de pino-encino.
<i>Phoradendron juniperinum</i>	Bosque de pino-encino.
<i>Phoradendron minutifolium</i>	Bosque de pino-encino.
<i>Phoradendron villosum</i>	Bosque de pino-encino.
<i>Phoradendron californicum</i>	Bosque de pino-encino.

<i>Phytophthora cinamomi</i>	Bosques templados
<i>Pithyophthorus spp</i>	Bosques templados
<i>Psittacanthus spp</i>	Bosque de pino-encino
<i>Rhynchophorus palmarum</i>	Palmares y zonas costeras
<i>Scolytus multistriatus</i>	Vegetación urbana y plantaciones forestales
<i>Scolytus spp</i>	Bosques templados
<i>Struthanthus quercicola</i>	Bosque de pino-encino
<i>Tillandsia recurvata</i>	Bosque de pino-encino
<i>Zadiprion falsus</i>	Bosques templados