

CRISPR/Cas: aplicaciones y perspectivas para el mejoramiento genético de plantas

Mairenys Concepción-Hernández

Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: mairenys@ibp.co.cu

RESUMEN

El desarrollo vertiginoso de la tecnología CRISPR/Cas en los últimos años, desde su descubrimiento como sistema inmune microbiano hasta su evolución como herramienta versátil y potente para la modificación de la función génica, constituye un manifiesto sobre cómo investigaciones básicas de impacto moderado pueden revolucionar las investigaciones biológicas. A partir de su aplicación como plataforma para la edición génica guiada por ARN, el sistema CRISPR/Cas se ha extendido hacia campos tan diversos como la regulación de la expresión génica, edición del epigenoma y visualización *in vivo* de la cromatina. En este artículo se introduce la tecnología CRISPR/Cas con énfasis en el sistema de tipo II CRISPR/Cas9 y se discuten sus principales aplicaciones en el mejoramiento genético en plantas. Igualmente, se destacan los avances y limitaciones del uso de la tecnología en plantas, y se delimitan las futuras perspectivas en el campo del mejoramiento genético.

Palabras clave: edición de genoma, estrés biótico y abiótico, ingeniería genética, modificación de función génica

CRISPR/Cas: applications and perspectives for plant genetic improvement

ABSTRACT

The rapid development of CRISPR/Cas technology in recent years, from its discovery as a microbial immune system to its evolution as a versatile and powerful tool for the modification of gene function, constitutes a statement on how basic research with a moderate impact can revolutionize biological investigations. From its application as a platform for RNA-guided gene editing, the CRISPR/Cas system has spread to fields as diverse as the regulation of gene expression, epigenome editing, and *in vivo* visualization of chromatin. In this article the CRISPR/Cas technology is introduced, with emphasis on the CRISPR/Cas9 type II system and its main applications in plant breeding are discussed. Likewise, advances and limitations in the use of this technology in plants are highlighted, and future perspectives in the field of genetic improvement are outlined.

Keywords: abiotic and biotic stress, gene function modification, genetic engineering, genome editing

INTRODUCCIÓN

La obtención de cultivares que permitan enfrentar la creciente demanda de alimento seguro para humanos y animales, así como la proveniente de las diversas aplicaciones industriales de las plantas, requiere de técnicas de mejoramiento genético versátiles, eficientes y rápidas.

La manipulación de la función génica es una herramienta básica en la obtención de

cultivares mejorados. Esta ha sido utilizada por los programas de mejoramiento genético tradicional a través de la incorporación de mutaciones naturales o inducidas en genotipos élites. A pesar de ser exitoso en la obtención de numerosas variedades, este enfoque es impreciso, trabajoso y azaroso. El desarrollo de las técnicas de secuenciación de ADN unido al aumento de la capacidad de procesamiento de los sistemas informáticos ha favorecido la disponibilidad de los genomas y

transcriptomas de un número siempre creciente de organismos. La acumulación de estudios moleculares, morfológicos y fisiológicos en plantas permitió la implementación de sistemas para la mutación dirigida, que requieren de un conocimiento profundo del proceso a modificar. El empleo de nucleasas específicas de sitio para la mutagénesis dirigida en plantas constituyó el siguiente paso en la evolución de las técnicas de precisión para la modificación de la función génica.

Hasta el año 2013 las herramientas para edición de genoma más utilizadas eran las nucleasas dedos de cinc (del inglés: *Zinc Finger Nucleases*, ZFN, Kim *et al.*, 1996) y las nucleasas tipo activadores de transcripción (del inglés: *Transcription Activator-like Effector Nuclease*, TALEN, Christian *et al.*, 2010). Ambas técnicas se basan en el empleo de proteínas de fusión que contienen un dominio manipulado artificialmente de unión al ADN, fusionado al dominio nucleasa de una enzima de restricción como FokI. Esta endonucleasa produce cortes en la doble cadena de ADN, los que son altamente tóxicos para la célula y se han de reparar. Este tipo de lesión se repara mediante los mecanismos de unión de extremos no homólogos (del inglés: *NHEJ, non homologous end joining*) y la recombinación homóloga (RH), los cuales generan variabilidad. La preferencia por un mecanismo u otro y sus resultados varía entre especies y tipo celular, siendo NHEJ la vía favorecida en las células vegetales, en las que el mecanismo de RH es más ineficiente en comparación con las células animales (Bortesi *et al.*, 2016). Como resultado de la reparación vía NHEJ se producen inserciones y deleciones aleatorias en la región del corte, siendo más frecuentes las deleciones de hasta 10 pb e inserciones de 1 pb. Por otro lado, la reparación vía RH emplea como molde una molécula de ADN homóloga, la que puede ser suministrada con el sistema, y facilitar la introducción de pequeñas modificaciones en la secuencia original, o la inserción precisa de un segmento de ADN foráneo. Además, la sustitución del dominio nucleasa por activadores o represores de la transcripción, genera un amplio espectro de posibilidades para la modulación de la expresión génica en plantas. En estos sistemas, el reconocimiento de la secuencia del ADN blanco se realiza por interacción de las respectivas bases nitrogenadas con los residuos aminoacídicos

de la proteína, lo que dificulta y enlentece su diseño.

En 2013 surgió una nueva herramienta para la edición génica denominada CRISPR/Cas (Cho *et al.*, 2013; Cong *et al.*, 2013; Hwang *et al.*, 2013; Jinek *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2013). Desde entonces, el número de publicaciones relacionadas aumentó exponencialmente en unos pocos años, hasta triplicar en 2015 las generadas por los métodos ZFN y TALEN unidos. Este desarrollo vertiginoso se debe a que el nuevo método es de ensamblaje sencillo y rápido, menos costoso y ofrece la capacidad de *multiplexing* o mutar varios genes simultáneamente, con el empleo de múltiples ARN guías (gARN) y una única nucleasa Cas. Adicionalmente, el sistema CRISPR/Cas se basa en el reconocimiento de la secuencia blanco mediante un ARN complementario, a diferencia de los métodos anteriores. En este artículo se describe el empleo del sistema CRISPR/Cas y se discuten las potencialidades y limitaciones de uso en el mejoramiento genético de plantas.

Sistema CRISPR/Cas: Orígenes y características

En 1987 un grupo de investigadores de la Universidad de Osaka, Japón, informó el descubrimiento de cinco repeticiones directas de 29 nucleótidos espaciadas por 32 nucleótidos en el genoma de *Escherichia coli*, cuya función biológica era desconocida (Ishino *et al.*, 1987). Años más tarde se indicó la presencia de estas repeticiones en otras especies de bacterias y *Archaea* como *Haloferax mediterranei*, *Streptococcus pyogenes*, *Anabaena* sp. PCC 7120 y *Mycobacterium tuberculosis* (Groenen *et al.*, 1993; Mojica *et al.*, 1995; Masepohl *et al.*, 1996; Hoe *et al.*, 1999). El término CRISPR (del inglés: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) fue acuñado para designar a estas secuencias repetidas y se traduce al español como repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (Jansen *et al.*, 2002). Estos investigadores identificaron además la presencia de genes asociados a CRISPR que denominaron *cas* (del inglés: *CRISPR-associated*). Así, un locus CRISPR consiste en repeticiones directas cortas separadas por secuencias denominadas espaciadores y flanqueadas por diversos genes *cas* (Barrangou *et al.*, 2007). En 2007, se

demonstró experimentalmente que estas secuencias forman parte de un sistema inmune adaptativo (Barrangou *et al.*, 2007). En este estudio, se adicionaron o eliminaron diferentes espaciadores a cepas de *Streptococcus thermophilus* lo que modificó su fenotipo de resistencia a fagos. Además, se confirmó mediante *knock-out* la participación de los genes *cas* en la resistencia a fagos y que ésta está determinada por la similitud de secuencias entre espaciadores y ADN viral. El funcionamiento del sistema CRISPR/Cas en bacterias fue dilucidado en numerosos microorganismos y se determinó que provee, además, protección específica de secuencia contra ADN foráneo plasmídico (Marraffini y Sontheimer, 2008), y en algunos casos ARN (Abudayyeh *et al.*, 2016).

La inmunidad conferida por el sistema CRISPR/Cas consta de tres etapas mecanísticas: adaptación, expresión e interferencia. Al producirse la entrada de ADN foráneo a la célula bacteriana, a causa de una infección viral o mediante transfección, este es reconocido, cortado en pedazos y los fragmentos obtenidos son incorporados al locus CRISPR en el ADN genómico de la bacteria. Durante este proceso se incorporan al azar diferentes fragmentos, lo que aumenta las posibilidades de adaptación del hospedante ante futuras infecciones del virus o plásmido correspondiente. Durante la etapa de expresión, el clúster CRISPR produce varios ARN CRISPR (crARN) de aproximadamente 40 nucleótidos de longitud que contienen el motivo protoespaciador adyacente (PAM), complementario al sitio de ADN foráneo y que permite a la célula distinguir entre ADN propio y no propio (van der Oost *et al.*, 2014). La hibridación de este crARN con el crARN transactivador (tracrARN) forma el ARN guía (gARN). El tracrARN es transcrito a partir de una secuencia adyacente al locus CRISPR y es esencial para el procesamiento del crARN y para el corte de ADN por el complejo de la nucleasa Cas9 (Jinek *et al.*, 2012).

En la etapa de interferencia, el gARN es reconocido por el complejo efector, que es dirigido por la complementariedad de bases entre 20 nucleótidos del extremo 5' del gARN y el ADN blanco. El corte del ADN

foráneo requiere la presencia del motivo PAM hacia el extremo 3' de la secuencia blanco. La secuencia PAM de la conocida Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) es 5'-NGG-3', donde N puede ser cualquiera de los cuatro nucleótidos (Mojica *et al.*, 2009). En algunos bacteriófagos se observó que mutaciones puntuales en la secuencia PAM evitaron su identificación por la nucleasa Cas, lo que permitió la evasión del sistema CRISPR/Cas (Bondy-Denomy *et al.*, 2013).

Existe gran diversidad entre los sistemas CRISPR/Cas descritos en cuanto a la composición de proteínas, arquitectura del locus, estructura del complejo efector y su mecanismo de acción. Makarova *et al.* (2015) propusieron una clasificación que dividía los sistemas CRISPR/Cas en dos clases principales de acuerdo con el análisis de las familias de proteínas y a las características de los loci CRISPR. La Clase I contiene complejos de efectores con múltiples subunidades mientras que en la Clase II las funciones del complejo efector son realizadas por una única proteína multidomínios de gran tamaño como es Cas9. La Clase I contiene los sistemas de tipo I que son más comunes y diversos, los sistemas de tipo III más abundantes en arqueas, así como los sistemas de tipo IV que carecen del módulo de adaptación. La Clase II incluye los bien caracterizados sistemas de tipo II que incluyen la endonucleasa efectora Cas9, utilizada ampliamente en la edición de genomas. Además, contiene los sistemas de tipo V que han sido probados experimentalmente e incluyen las proteínas efectoras Cas12a–e (Shmakov *et al.*, 2017). Estas proteínas poseen un dominio RuvC que corta la simple cadena de ADN, excepto Cas12a (también Cpf1) que tiene además un dominio catalítico que participa en el procesamiento del pre-crARN (Fonfara *et al.*, 2016). Por otra parte, los sistemas efectores de tipo VI contienen dos dominios HEPN de posible actividad RNasa (Koonin *et al.*, 2017). La descripción de sistemas que no se ajustan a la clasificación anterior indica que aún existen nuevos tipos y subtipos por clasificar.

Solo los sistemas de Clase II han sido adaptados para la modificación de genomas, en particular, el sistema CRISPR/Cas9. La disección de sus componentes permitió

determinar que el sistema de interferencia por CRISPR/Cas requiere como elementos necesarios y suficientes la nucleasa Cas9, el crARN y el tracrARN (Jinek *et al.*, 2012). Adicionalmente, estos investigadores redujeron los elementos del sistema a la nucleasa Cas9 y un ARN de guía única donde se fusionan el crARN y el tracrARN llamado ARN de guía única (sgARN). La funcionalidad del sgARN fue demostrada en eucariontes (Cho *et al.*, 2013; Hwang *et al.*, 2013; Jinek *et al.*, 2013) mientras que Cong *et al.* (2013) y Mali *et al.* (2013) mostraron además, que se podían editar múltiples loci mediante el uso de diferentes sgARN. Desde entonces, se ha optimizado la eficiencia de los sgARN en el cultivo de células y se han diversificado sus aplicaciones. Así, un diseño eficiente para la edición de genomas incluye una larga cola de tracrARN que contiene la horquilla 3' nativa y una extensión de 5 pb del dúplex crRNA-tracrRNA (Chen y Doudna, 2017). Actualmente, el sistema CRISPR/Cas9 se ha constituido en una plataforma universal para la modificación del genoma guiada por ARN.

La enzima Cas9

La proteína Cas más utilizada hasta la fecha para la edición de genomas es SpCas9, que es una endonucleasa multidomínios y multifuncional de gran tamaño (1 368 aa). La estructura cristalina de los subtipos principales SpCas9 y AnaCas9 (*Actinomyces naeslundii*) de esta enzima muestran un núcleo funcional conservado que contiene los dominios endonucleasa, una región rica en arginina y un dominio de topología, con dominios α -hélice y C-terminal divergentes (Jinek *et al.*, 2014). En otro estudio, la estructura del complejo Cas9-sgARN-ADN blanco reveló una organización bilobular, compuesta por un lóbulo α -hélice de reconocimiento (REC) y un lóbulo nucleasa (NUC) que contiene los dominios HNH, subdomínios RuvC ensamblados, y una región C-terminal que interactúa con el PAM (PI) (Nishimasu *et al.*, 2014). Estos dos estudios muestran una conformación de autoinhibición de la apoenzima (enzima inactiva) en que el dominio RuvC bloquea el sitio activo del dominio HNH. Asimismo, se observó que existen impedimentos estéricos para la unión del heterodúplex gARN-ADN a la apoenzima, por lo se propuso que Cas9 se pliega y organiza alrededor del gARN (Nishimasu *et al.*, 2014). Por otro lado, la

región rica en arginina está conservada entre las proteínas Cas9 y es crítica para el reconocimiento sgARN:ADN.

El reconocimiento del sitio PAM en SpCas9 es realizado por dos residuos de arginina del sitio PI. Mediante experimentos con moléculas simples, Sternberg *et al.* (2014) demostraron que el complejo Cas9-sgARN se une a la molécula blanco mediante una secuencia PAM. En este trabajo se definió el papel de la denominada región 'semilla' del crARN, que define la especificidad en el reconocimiento de la secuencia blanco. Se observó que la ocurrencia de desapareamientos en los 10-12 nucleótidos próximos al sitio PAM hacia el extremo 3' del crARN impide la unión del ADN blanco y el corte por la Cas9 en los sistemas CRISPR de tipo II. Adicionalmente, los cortes *off-target* (fuera de la región deseada) aumentan en secuencias con alta homología con la secuencia 'semilla' (Pattanayak *et al.*, 2013). El tiempo que permanece unida la enzima depende de la complementariedad de bases con el gARN, y esta se disocia rápidamente del ADN que no contiene sitios PAM (Knight *et al.*, 2015).

La enzima Cas9 produce dos cortes que generan extremos romos en la doble cadena de ADN, tres bases arriba del extremo 3' del PAM mediante la actividad nucleasa de los dominios HNH y RuvC. El dominio HNH corta la cadena complementaria al gARN mientras que el dominio RuvC corta la cadena no complementaria. En la enzima SpCas9, el sitio catalítico del dominio HNH contiene tres residuos aminoacídicos (Asp⁸³⁹, His⁸⁴⁰ y Asn⁸⁶³) mientras que el dominio RuvC tiene los residuos Asp¹⁰, Glu⁷⁶², His⁹⁸³ y Asp⁹⁸⁶ (Anders *et al.*, 2014, Nishimasu *et al.*, 2014). Una revisión detallada sobre el reconocimiento y corte de la secuencia blanco mediado por Cas-ARN desde un enfoque mecanístico y estructural es brindado por Jiang y Doudna (2017).

SpCas9 reconoce la secuencia PAM 5'-NGG-3' y con menos especificidad la 5'-NAG-3' (Nakade *et al.*, 2017). Sin embargo, esta secuencia no siempre se encuentra con facilidad en la cercanía de la secuencia blanco, sobre todo si es una región rica en AT. De igual manera, el gran tamaño de la proteína Cas9 (1 368 aa), unido a la generación de mutaciones

inespecíficas de difícil predicción por los análisis de similitud de secuencias, limitan las aplicaciones de SpCas9. Por tanto, varios estudios se han enfocado en la identificación y empleo de homólogos pertenecientes a otras bacterias y la descripción de nuevos sistemas CRISPR/Cas que superen las limitaciones anteriores. Hasta la fecha se han utilizado en la edición de genomas más de diez proteínas Cas diferentes. Entre estas, destacan Cas9 de *Staphylococcus aureus* (SaCas9, 1053aa) (Mojica *et al.*, 2009), *Neisseria meningitidis* (NmCas9, 1082 aa) (Hou *et al.*, 2013) y *Campylobacter jejuni* (CjCas9, 984 aa) (Kim *et al.*, 2017). A pesar de ser más pequeñas, estas proteínas son menos flexibles en su acción que SpCas9, debido a que utilizan sitios PAM más complejos. Otro descubrimiento interesante fue el de las enzimas Cpf1 de Clase II tipo V, que al igual que Cas9 cortan el ADN blanco por complementariedad con un ARN guía (Zetsche *et al.*, 2015). Estas enzimas requieren un único ARN guía y reconocen sitios PAM ricos en timina, en contraste con los sitios PAM ricos en guanina de Cas9. Notablemente, Cpf1 contiene el dominio endonucleasa RuvC y otro nuevo dominio endonucleasa (Yamano *et al.*, 2016) que generan extremos 5' protuberantes (Zetsche *et al.*, 2015) a diferencia de los extremos romos generados por Cas9 (Garneau *et al.*, 2010).

Numerosos trabajos han estado dirigidos a la obtención de variantes mejoradas de Cas9 con un aumento de su fidelidad y mayor versatilidad. Dos variantes de SpCas9, eSp-Cas9 (Slaymaker *et al.*, 2016) y SpCas9-HF (Kleinstiver *et al.*, 2016) fueron obtenidas a través de mutaciones que minimizaban la interacción de la proteína con el ADN blanco, lo que provocó un aumento de la especificidad. De igual manera, se han probado funcionalmente variantes de SpCas9, obtenidas mediante evolución molecular, con diferente reconocimiento de la secuencia PAM como VQR, EQR y VRER (Kleinstiver *et al.*, 2015). La primera variante reconoce la secuencia 5'-NGAN-3' con afinidades que varían en el siguiente orden NGAG > NGAT = NGAA > NGAC. La segunda variante reconoce la secuencia 5'-NGAG-3' y la tercera la secuencia 5'-NGCG-3'. La variante FnCas9 RHA: E1369R/E1449H/R1556A de *Francisella novicida* requiere la secuencia PAM más corta conocida 5'-YG-3' donde Y puede ser C o T (Hirano *et al.*,

2016). El uso de estas variantes, sin embargo, pudiera complejizar los experimentos y comprometer la eficiencia por la especificidad.

Entre las modificaciones realizadas a Cas9 se distingue la obtención de mutantes de las actividades nucleasas de los dominios HNH, RuvC o de ambos. La mutación de uno de los dominios, genera una 'nicasa' (nCas9) que produce un corte en la simple cadena de ADN y favorece la vía de reparación por RH (Jinek *et al.*, 2012). En cambio, cuando se mutan los dos dominios, se obtiene la denominada 'dead' Cas9 (dCas9, Qi *et al.*, 2013), sin actividad nucleasa y que en unión a otros dominios puede emplearse en la activación y represión de la transcripción (Garneau *et al.* 2010; Sander y Joung, 2014).

De especial relevancia es el uso de la nCas9 fusionada a enzimas modificadoras de bases nitrogenadas en lo que se conoce como herramientas de segunda generación para la edición de genomas, al ser capaces de modificar bases nitrogenadas sin introducir cortes en la doble cadena de ADN. Este campo ha recibido gran atención por las numerosas posibilidades que brinda. Así se logra la conversión de C a T, o A a G (Komor *et al.*, 2016; Gaudelli *et al.*, 2017), lo que permite alterar el código genético, e incluso introducir codones de parada prematuros en los genes (Kuscu *et al.*, 2017).

Adicionalmente, el uso de dos sgARN diferentes para realizar un doble corte en conjunto con nCas9 (Mali *et al.*, 2013, Ran *et al.*, 2013) o con dCas9 fusionado con FokI (Guillinger *et al.*, 2014, Tsai *et al.*, 2014) se ha utilizado con éxito para disminuir los *off-target* en células de mamíferos. Esta estrategia tiene como limitante que reduce significativamente los sitios de corte disponibles en la secuencia de interés al emplear dos sgARN.

Aplicaciones de CRISPR/Cas en biotecnología vegetal

Las potencialidades del sistema CRISPR/Cas para la biología y el mejoramiento genético de plantas fueron comprendidas rápidamente por los investigadores y en 2013 aparecieron las primeras publicaciones al respecto (Li *et al.*, 2013; Nekrasov *et al.*, 2013; Shan *et al.*, 2013).

Particularidades del sistema CRISPR/Cas en plantas

A diferencia de las células animales, en las plantas la pared celular constituye un obstáculo físico entre la secuencia blanco y los componentes del sistema CRISPR, la proteína Cas, el gARN y ADN donante para la recombinación homóloga, por lo que el sistema empleado de entrega de estos componentes determina la eficiencia del proceso. Así, existen varios sistemas de entrega que permiten la expresión transitoria del gen *cas9* y los sgARN, la co-transformación estable de *cas9* y los sgARN o variantes combinadas de las anteriores.

La transformación genética con un vector que contiene el gARN y el gen *cas9* permite la obtención de plantas que expresan de forma estable o transitoria estos genes. El empleo de la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* se ha logrado en múltiples especies de plantas, y posee como ventajas fundamentales la incorporación de un número bajo de copias del gen de interés y ser de aplicación fácil y poco costosa, por lo que constituye el método más utilizado.

El empleo de la microinyección, bombardeo de partículas y transformación de protoplastos mediante polietilenglicol (PEG) se utilizan en especies donde la transformación con *A. tumefaciens* no es posible.

El uso exitoso del CRISPR/Cas en plantas requiere además de la optimización de codones y el uso de promotores adecuados para Cas, así como del sgARN, y de la adición de una señal de localización nuclear. Generalmente, la expresión de sgARN es regulada por promotores de la ARN polimerasa III como AtU6, TaU6, responsables de la expresión de ARN de pequeño tamaño. Igualmente, el gen *cas9* se sitúa bajo la acción de promotores de ARN polimerasa II que guían la expresión de ARN de mayor tamaño, como 35S y ubiquitina.

Dado su origen bacteriano, la expresión de la proteína Cas en el tejido vegetal no es siempre eficiente, de ahí que se han generado múltiples versiones con optimización del uso codones para varias especies, tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas. La mayoría de los trabajos utilizan versiones de SpCas9 con codones optimizados para

humanos (Li *et al.*, 2013; Miao *et al.*, 2013) o plantas (Feng *et al.*, 2013; Nekrasov *et al.*, 2013; Xie y Yang, 2013).

Adicionalmente, el sistema de expresión, los sitios de restricción disponibles y los objetivos de la investigación determinan el tipo de vector a utilizar. Así, diferentes plásmidos pueden ser estudiados en el sitio <https://www.addgene.org/crispr/plant/>. Esto se ve favorecido con la creciente disponibilidad de vectores que contienen el sistema con diversas posibilidades para su clonaje como los sistemas Gateway y ensamblaje de Gibson.

Los vectores virales se han empleado con éxito para la transferencia de ADN a células animales y vegetales. Sin embargo, su uso con los componentes del sistema CRIPR/Cas9 está limitado por el gran tamaño de la proteína Cas9, lo que dificulta su empaquetado. Una de las aplicaciones más atractivas de los vectores virales es la entrega del ADN molde para la reparación por RH, debido a que garantiza altas concentraciones del mismo (Wang *et al.*, 2017).

El uso de complejos ribonucleoproteicos (RNP) Cas9-sgRNA pre-ensamblados *in vitro* constituye una alternativa a esta situación y posee como ventaja que no involucra la integración de un transgén o la inserción de fragmentos de ADN en los nuevos mutantes. En este sentido, Woo *et al.* (2015) lograron la mutagénesis dirigida mediante transfección de protoplastos de *Arabidopsis thaliana* L. (Heynl, *Nicotiana tabacum* L., *Lactuca sativa* L., y *Oryza sativa* L. con RNP Cas9-sgRNA y el uso de PEG. Posteriormente, Svitashv *et al.* (2016) obtuvieron plantas de maíz (*Zea mays* L.) con alelos mutados a través del bombardeo de embriones inmaduros con RNP. Otro grupo (Liang *et al.*, 2017) utilizó una estrategia idéntica para editar embriones inmaduros de trigo (*Triticum aestivum* L.). En ambos trabajos se mostró la reducción de los efectos *off-target* en comparación con células transfectadas con ADN, posiblemente debido a la disminución del tiempo de acción del RNP, que es degradado rápidamente en la célula vegetal. Esto último, sin embargo, resulta una limitante del empleo de RNP cuando se requiere la expresión estable o alta de los componentes del sistema CRISPR.

Por otra parte, el diseño del gARN es crítico al afectar la eficiencia y la especificidad del

sistema CRISPR/Cas. Varios softwares están disponibles para el diseño de gARN, que utilizan información de los genomas publicados por especies para la predicción de *off-targets* de cada gRNA. Así mismo debe considerarse la presencia de sitios de reconocimiento de enzimas de restricción en la secuencia a modificar que facilite el análisis de los resultados de la edición. Aunque el empleo de un único sgARN permite la obtención de modificaciones, se ha propuesto que la eficiencia de edición aumenta al emplear un mayor número de secuencias guía.

Métodos de detección de las modificaciones producidas por el sistema CRISPR/Cas

Las mutaciones generadas por el sistema CRISPR/Cas9 pueden ser de varios tipos: heterocigóticas, homocigóticas o bialélicas (mutaciones alélicas diferentes). Los métodos para su detección son numerosos y han sido considerados anteriormente por Zischewski *et al.* (2017). Entre los más empleados se encuentra el método de PCR suprimido por digestión con enzima de restricción (RE-PCR, del inglés: *restriction enzyme digestion suppressed PCR*), que identifica las mutaciones introducidas por NHEJ (Xie y Yang, 2013). Otros métodos hacen uso de nucleasas que identifican la presencia de desapareamientos en la molécula de ADN debido a inserciones/delecciones o sustituciones de bases nitrogenadas, como T4E7 y T7E1 de origen viral. Las variantes de origen vegetal de estas enzimas son conocidas como 'surveyor', y producen un corte con alta especificidad en el extremo 3' del sitio de desapareamiento (Vouillot *et al.*, 2015). Los métodos anteriores permiten la detección de mutaciones mediante electroforesis en gel de agarosa. Otra alternativa para la detección de mutantes es la secuenciación por el método de Sanger de un fragmento de PCR que incluya las regiones que se deseaban modificar. La secuenciación total del genoma mediante técnicas de próxima generación (*Next generation sequencing*) permite además detectar la ocurrencia de *off-targets*.

Mejoramiento genético

La edición de genoma por CRISPR/Cas se ha utilizado en plantas para aumentar el rendimiento, la resistencia a microorganismos

patógenos, el valor nutricional y la tolerancia a estrés abiótico.

Mejoramiento a estrés biótico y abiótico

El número de plantas resistentes obtenidas con la tecnología CRISPR/Cas aumenta cada año (Tabla 1).

La mutación de genes de susceptibilidad, que facilitan la compatibilidad planta-patógeno, podría proveer una resistencia más duradera y de amplio espectro que la conferida por genes de resistencia (van Schie y Takken, 2014). Ejemplo de esto lo constituye el empleo de mutantes del gen de susceptibilidad *mlo* en cebada por más de 50 años en campo y con resistencia al oídio (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) (Freisleben *et al.*, 1942). Estos genes muestran un papel en la susceptibilidad a microorganismos patógenos que se conserva tanto en plantas dicotiledóneas como monocotiledóneas. Así, Nekrasov *et al.* (2017) editaron el gen SIM1 de tomate mediante el uso de dos sgARN. Las plantas modificadas de la generación T0 mostraron delecciones de 48 pb mientras que su progenie mostró resistencia a *Oidium neolycopersici* sin afectaciones en la morfología de la planta y rendimiento del fruto.

Por otro lado, Wang *et al.* (2014) lograron la modificación simultánea de tres alelos homólogos del gen *TaMlo-A1* de trigo. Este trabajo demostró, además, la factibilidad del uso del sistema CRISPR en especies poliploides como es el caso del trigo hexaploide.

El gen *OsERF922* es un regulador negativo de la inmunidad de *O. sativa* frente *Magnaporthe oryzae* (Liu *et al.*, 2012). Wang *et al.* (2016) utilizaron un sgARN para obtener mutantes con cambios en el marco de lectura de este gen.

Es destacable que el silenciamiento de este gen incrementó la resistencia a *M. oryzae* (Wang *et al.*, 2016). Las líneas mutadas libres del transgén pertenecientes a las generaciones T1 y T2 mostraron una disminución de la incidencia de la enfermedad y sus características agronómicas no resultaron afectadas. Estas líneas fueron seleccionadas mediante segregación.

Tabla 1. Algunos cultivos mejorados mediante CRISPR/Cas para resistencia a microorganismos patógenos.

Cultivo/ Microorganismo	Gen modificado/ Tipo de modificación	Versión de Cas9	Promotores Cas9/ sgARN	Método de entrega/ frecuencia de mutación	Referencias
<i>Oryza sativa</i> / <i>Xanthomonas oryzae</i>	<i>OsSWEET11</i> <i>OsSWEET14</i> / I, D	SpCas9 y SpCas9 con CO para arroz	CaMV35S/ AtU6	Transf. de protoplastos con PEG/ ND	Jiang <i>et al.</i> , 2013
<i>Oryza sativa</i> / <i>Magnaporthe oryzae</i>	<i>OsERF922</i> / I,D	SpCas9 CO para plantas	Ubiquitina 1 de maíz/ U6 de arroz	Transf. de callos embriog. con <i>At</i> /42.0%	Wang <i>et al.</i> , 2016
<i>Nicotiana benthamiana</i> / BeYDV	<i>BeYDV</i> /A,D	SpCas9 CO para plantas	35SPPDK/ AtU6	Coilnfiltración de hojas con <i>At</i> /0.03-70.01%	Baltes <i>et al.</i> , 2015
<i>Nicotiana benthamiana</i> / TYLCV, BCTV	<i>TYLCV-IR</i> regiones intergénicas, regiones RCA/ I, D	SpCas9 CO para plantas	CaMV35S/ promotor del PEBV	Transfección con virus de sgRNA en plantas que sobrespresan Cas9/42%	Ali <i>et al.</i> , 2015
<i>Cucumis sativus</i> L./ CVYV, ZYMV, PRSV	<i>eIF4E</i> / D en Exon1	SpCas9 CO para plantas	CaMV35S/ AtU6	Transf. de cotiledones sin embrión con <i>At</i> /ND	Chandrasekaran <i>et al.</i> , 2016
<i>Triticum aestivum</i> / <i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>	<i>TaMLO-A1</i> <i>TaMLO-B1</i> <i>TaMLO-D1</i> / D en Exon2	Cas9 CO para arroz	Ubiquitina 1 de maíz/ promotor U6 de trigo	Bombardeo de partículas/ 5.6%	Wang <i>et al.</i> , 2014
<i>Citrus sinensis</i> / <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	<i>CsLOB1</i> / D, S	Cas9 CO para plantas	35SPPDK/ AtU6-1	Transf. de epicotilos con <i>At</i> / 11.5%– 64.7%	Peng <i>et al.</i> , 2017
<i>Solanum lycopersicum</i> / <i>Oidium neolycopersici</i>	<i>SIMlo1</i> /D en ORF	Cas9 CO para humanos	CaMV35S/ AtU6	Transf. de segmentos cotiledonares con <i>At</i> / ND	Nekrasov <i>et al.</i> , 2017
<i>S. lycopersicum</i> / <i>Xanthomonas gardneri</i> Xg153, <i>X. perforans</i> Xp4b, <i>Pseudomonas syringae</i> DC3000, <i>Phytophthora capsici</i> LT1534	<i>SIDMR6</i> / D	ND	2 × CaMV35S/ AtU6-26	Transf. de segmentos cotiledonares con <i>At</i> / ND	de Toledo <i>et al.</i> , 2016

ND: no disponible, sgARN: ARN de guía única, D: deleciones, I: inserciones, S: sustituciones, *At Agrobacterium tumefaciens*, CO: codones optimizados, CVYV: *Cucumber vein yellowing virus*/Virus de las venas amarillas del pepino, ZYMV: *Zucchini yellow mosaic virus*/Virus del mosaico amarillo del calabacín, PRSV: *Papaya ring spot virus*/Virus de la mancha anular de la papaya, TYLCV: *Tomato yellow leaf curl virus*/ Virus del rizado amarillo del tomate, BCTV: *Beet curly top virus*/Virus de la cresta rizada de remolacha, BeYDV: *Bean yellow dwarf virus*/ Virus del mosaico enano del frijol, PEBV: *Pea early browning virus*/Virus del bronceado temprano del guisante

de Toledo *et al.* (2016) generaron plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) que presentaban mutaciones que afectaban el sitio activo de la enzima SIDMR6. Una de las líneas obtenidas mostró resistencia parcial y de amplio espectro frente a tres bacterias diferentes (*Xanthomonas gardneri* Xg153, *Xanthomonas perforans* Xp4b, *Pseudomonas*

syringae DC3000) y el oomicete *Phytophthora capsici* LT1534.

El factor de iniciación eIF4E participa en la traducción del ARNm en eucariontes y a la vez está relacionado con la resistencia recesiva a virus. Recientemente, Chandrasekaran *et al.* (2016) utilizaron CRISPR/

Cas9 para mutar dicho gen y aumentar la resistencia a los virus *Cucumber vein yellowing virus* (Ipomovirus) y los potivirus *Zucchini yellow mosaic virus* y *Papaya ring spot mosaic virus-W*, en plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.). Debido a la naturaleza recesiva de este tipo de resistencia solo los mutantes homocigóticos mostraron un aumento en la resistencia.

Por otro lado, Peng *et al.* (2017) modificaron el promotor del gen de susceptibilidad *CsLOB1* y aumentaron la resistencia a *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. En este estudio el 42% de las plantas mutantes tenían las modificaciones deseadas y de estas, el 23.5% mostró resistencia a la enfermedad.

La productividad de los cultivos a nivel mundial está limitada por la existencia de condiciones ambientales adversas como déficit hídrico, altas temperaturas, elevada salinidad y baja calidad nutricional de los suelos. Sin embargo, el uso de CRISPR/Cas en la obtención de variedades tolerantes a estrés biótico tiene potencialidades aun no explotadas por los mejoradores.

Osakabe y Osakabe (2017) mostraron la mutación del gen de respuesta a estrés abiótico *OST2/AHA1* mediante el uso de gARN truncados (tru-gRNA) y *Cas9* guiada por el promotor específico de tejido *AtEF1* en *A. thaliana*. Los mutantes homocigóticos obtenidos mostraron un aumento en la respuesta estomática y menor pérdida de agua que las plantas no mutadas.

Ingeniería metabólica

Otro campo de múltiples posibilidades de aplicación de CRISPR/Cas es la ingeniería metabólica en plantas. Al permitir la manipulación de varios genes a la vez, la edición por CRISPR/Cas es ideal para intervenir rutas metabólicas compuestas en su mayoría por un número elevado de productos génicos.

Por ejemplo, Alagoz *et al.* (2016) manipularon la vía de biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos en *Papaver somniferum* L. mediante la edición del gen *4'OMT2*, lo que provocó cambios en el perfil de alcaloides derivados de esta ruta metabólica. En otro estudio, Li *et al.* (2017) modificaron el gen de

la diterpeno sintasa (*SmCPS1*) que participa en la biosíntesis de tanshinone en *Salvia miltiorrhiza* Bunge, una planta medicinal. Los mutantes homocigóticos se obtuvieron mediante transformación con *Rhizobium rhizogenes* y no mostraron acumulación de tanshinone.

Recientemente, Tang *et al.* (2017) desarrollaron líneas de arroz con knock-out del gen *OsNramp5* que codifica para un transportador de metales. Estas líneas mostraron una baja acumulación de cadmio en los granos sin afectaciones en su rendimiento. Este trabajo muestra una aplicación práctica de la tecnología para la producción de alimentos con menor riesgo de contaminación.

Perspectivas, limitaciones y cuestiones éticas

La tecnología CRISPR/Cas avanza rápidamente, y entre las principales líneas de investigación se encuentra el aumento de la eficiencia y la disminución de los efectos *off-target*. Las principales estrategias para la reducción de *off-targets* incluyen modificaciones en el tamaño del sgARN, el empleo de RNP y la modificación de la proteína Cas (mutaciones puntuales, nicasas apareadas y nicasas dimerizadas) y de su concentración (Hsu *et al.*, 2013). Por otro lado, la mayoría de las investigaciones emplean el silenciamiento de genes mediante la reparación por NHEJ, mientras que la mutagénesis dirigida a través de RH resulta un desafío por su baja probabilidad de ocurrencia en plantas y las dificultades para la transferencia de sus componentes al núcleo de la célula vegetal (Steinert *et al.*, 2016). Sin embargo, se han comenzado a dar algunos pasos de avance en este sentido. Gil Humanes *et al.* (2017) describieron el uso de una versión deconstruida del *Virus del enanismo del trigo* para la mutación simultánea de tres homocigotos del gen de ubiquitina, con una frecuencia aproximada del 1%.

Otra línea de avance vertiginoso de las investigaciones en CRISPR/Cas es el empleo de variantes modificadas de la proteína Cas9 como dCas9, y proteínas de fusión a Cas9. dCas9 puede utilizarse como represor de la transcripción, sin embargo, puede fusionarse

a otros represores y activadores con diferencias en su actividad (Piatek *et al.*, 2015). La fusión de Cas9 con acetiltransferasas o metilasas de histonas ha permitido la activación y represión, respectivamente, de la transcripción de los genes blancos (Hilton *et al.*, 2015; Choudhury *et al.*, 2016). Otra variante atractiva es el uso de sondas fluorescentes con dCas9 para el marcaje *in situ* de ADN y las fusiones con proteínas fluorescentes para el estudio *in vivo* de la dinámica de los cromosomas (Chen *et al.*, 2013). Sin embargo, estas variantes no han sido desarrolladas completamente en plantas.

En 2016 el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos no reguló el cultivo y comercialización del champiñón (*Agaricus bisporus*) modificado por CRISPR/Cas9 para evitar su fenolización (Waltz, 2016). Este pronunciamiento de una agencia reguladora permite disminuir considerablemente el tiempo y los costos asociados a la salida al mercado de los productos generados por CRISPR/Cas. Las posibilidades que esta tecnología brinda para la generación de conocimientos y productos de interés agrícola, reclaman la atención de la comunidad científica, las compañías productoras de alimentos y los organismos creadores de políticas. El sistema CRISPR/Cas resulta especialmente significativo para los países en vías de desarrollo, como un útil instrumento en la búsqueda de soluciones a las crisis alimentarias, los efectos del cambio climático y la dependencia tecnológica de estas naciones.

CONCLUSIONES

El sistema CRISPR/Cas ha revolucionado en pocos años la biología molecular, la medicina y la biotecnología. Este constituye además una valiosa herramienta para el mejoramiento genético de plantas frente a microorganismos patógenos, si se considera la dinámica de las interacciones y las dificultades de los mejoradores de plantas en la obtención de información relevante sobre los mecanismos moleculares involucrados en la resistencia y susceptibilidad y la modificación de genes en un tiempo breve.

La identificación y descripción de sistemas CRISPR aun desconocidos advierte el descubrimiento de nucleasas con diferentes

especificidades, y de nuevos conocimientos sobre la inmunidad en microorganismos. CRISPR/Cas ha abierto el camino para una nueva era en la agricultura, donde los debates sobre la ética y las regulaciones sobre el uso de esta tecnología determinarán su alcance en los años que están por venir.

REFERENCIAS

Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, Joung J, Slaymaker IM, Cox DB, Severinov K (2016) C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science* 353(6299): 0aaf5573; doi: 10.1126/science.aaf5573

Alagoz Y, Gurkok T, Zhang B, Unver T (2016) Manipulating the biosynthesis of bioactive compound alkaloids for next-generation metabolic engineering in opium poppy using CRISPR-Cas 9 genome editing technology. *Sci Rep* 6: 30910; doi: 10.1038/srep30910

Ali Z, Abulfaraj A, Idris A, Ali S, Tashkandi M, Mahfouz MM (2015) CRISPR/Cas9-mediated viral interference in plants. *Genome Biology* 16: 238; doi: 10.1186/s13059-015-0799-6

Anders C, Niewoehner O, Duerst A, Jinek M (2014) Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature* 513(7519): 569; doi: 10.1038/nature13579

Baltes NJ, Hummel AW, Konecna E, Cegan R, Bruns AN, Bisaro DM, Voytas DF (2015) Conferring resistance to geminiviruses with the CRISPR–Cas prokaryotic immune system. *Nature Plants* 1: 15145; doi: 10.1038/nplants.2015.145

Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Horvath P (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315(5819): 1709-1712; doi: 10.1126/science.1138140

Bondy-Denomy J, Pawluk A, Maxwell KL, Davidson AR (2013) Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. *Nature* 493(7432): 429; doi: 10.1038/nature11723

Bortesi L, Zhu C, Zischewski J, Perez L, Bassié L, Nadi R, Medina V (2016) Patterns of CRISPR/

- Cas9 activity in plants, animals and microbes. *Plant Biotechnology Journal* 14(12): 2203-2216; doi: 10.1111/pbi.12634
- Chandrasekaran J, Brumin M, Wolf D, Leibman D, Klap C, Pearlsman M (2016) Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Mol Plant Pathol* 17: 1140–1153; doi: 10.1111/mpp.12375
- Chen B, Gilbert LA, Cimini BA, Schnitzbauer J, Zhang W (2013) Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell* 155: 1479–91; doi: 10.1016/j.cell.2013.12.001
- Chen JS, Doudna JA (2017) The chemistry of Cas9 and its CRISPR colleagues. *Nat Rev Chem* 1: 0078; doi: 10.1038/s41570-017-0078
- Cho SW, Kim S, Kim JM, Kim JS (2013) Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature biotechnology* 31(3): 230; doi: 10.1038/nbt.2507
- Choudhury SR, Cui Y, Lubecka K, Stefanska B, Irudayaraj J (2016) CRISPR-dCas9 mediated TET1 targeting for selective DNA demethylation at BRCA1 promoter. *Oncotarget* 7: 46545–56; doi: 10.18632/oncotarget.10234
- Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, Voytas DF (2010) Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* 186(2): 757-761; doi: 10.1534/genetics.110.120717
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Zhang F (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339(6121):819-823; doi: 10.1126/science.1231143
- de Toledo DP, Brail Q, Dahlbeck D, Staskawicz BJ (2016) CRISPR-Cas9 mediated mutagenesis of a DMR6 ortholog in tomato confers broad-spectrum disease resistance. *bioRxiv* 064824:0; doi: 10.1101/064824
- Feng Z, Zhang B, Ding W, Liu X, Yang DL, Wei P (2013) Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Res* 23: 1229–1232; doi: 10.1038/cr.2013.114
- Fonfara I, Richter H, Bratoviè M, Le Rhun A, Charpentier E (2016) The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA. *Nature* 532(7600): 517; doi: 10.1038/nature17945
- Freisleben R, Lein A (1942) Über die Aufzucht einer Mehltaresistenten Mutante nach Röntgenbestrahlung einer Anfalligen Reinen Linie von Sommergerste. *Naturwissenschaften* 30(40): 608-608; doi: 10.1007/BF01488231
- Garneau JE, Dupuis ME, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, Fremaux C, Horvath P, Magada ´n AH, Moineau S (2010) The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* 468: 67–71; doi: 10.1038/nature09523
- Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, Packer MS, Badran AH, Bryson DI, Liu DR (2017) Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature* 551(7681): 464; doi: 0.1038/nature24644
- Gil Humanes J, Wang Y, Liang Z, Shan Q, Ozuna CV, Sánchez León S, Voytas DF (2017) High efficiency gene targeting in hexaploid wheat using DNA replicons and CRISPR/Cas9. *The Plant Journal* 89(6): 1251-1262; doi: 10.1111/tpj.13446
- Groenen PM, Bunschoten AE, Soolingen DV, Errtbden JDV (1993) Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*, application for strain differentiation by a novel typing method. *Molecular Microbiology* 10(5): 1057-1065; doi: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb00976.x
- Guillinger JP, Thompson DB, Liu DR (2014) Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. *Nature Biotechnology* 32(6): 577; doi: 10.1038/nbt.2909
- Hilton IB, D'Ippolito AM, Vockley CM, Thakore PI, Crawford GE (2015) Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nat Biotechnol* 33: 510–17; doi: 10.1038/nbt.3199

- Hirano H, Gootenberg JS, Horii T, Abudayyeh OO, Kimura M, Hsu PD, Nishimasu, H (2016) Structure and engineering of Francisella novicida Cas9. *Cell* 164(5): 950-961; doi: 10.1016/j.cell.2016.01.039
- Hoe N, Nakashima K, Grigsby D, Pan X, Dou SJ, Naidich S, Musser JM (1999) Rapid molecular genetic subtyping of serotype M1 group A *Streptococcus* strains. *Emerg Infect Dis* 5: 254-263; doi: 10.3201/eid0502.990210
- Hou Z, Zhang Y, Propson NE, Howden SE, Chu LF, Sontheimer EJ, Thomson JA (2013) Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci* 110(39): 15644-15649; doi: 10.1073/pnas.1313587110
- Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, Cradick TJ (2013) DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology* 31(9): 827; doi: 10.1038/nbt.2647
- Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, Joung JK (2013) Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology* 31(3): 227; doi: 10.1038/nbt.2501
- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A (1987) Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol* 169(12): 5429-33; doi: 10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987
- Jansen R, Embden JDAV, Gaastra W, Schouls LM (2002) Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol* 43: 1565-1575; doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x
- Jiang W, Zhou H, Bi H, Fromm M, Yang B, Weeks DP (2013) Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Research* 41(20): e188-e188; doi: 10.1093/nar/gkt780
- Jiang F, Doudna JA (2017) CRISPR-Cas9 structures and mechanisms. *Annual review of biophysics* 46: 505-529; doi: 10.1146/annurev-biophys-062215-010822
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337: 816-821; doi: 10.1126/science.1225829
- Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J (2013) RNA-programmed genome editing in human cells. *eLife* 2: e00471; doi: 10.7554/eLife.00471
- Jinek M, Jiang F, Taylor DW, Sternberg SH, Kaya E, Ma E, Kaplan M (2014) Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science* 343(6176): 1247997; doi: 10.1126/science.1247997
- Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S (1996) Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci* 93: 1156-1160; doi: 10.1073/pnas.93.3.1156
- Kim E, Koo T, Park SW, Kim D, Kim K, Cho HY, Kim JH (2017) *In vivo* genome editing with a small Cas9 orthologue derived from *Campylobacter jejuni*. *Nature Communications* 8: 14500
- Koonin EV, Makarova KS, Zhang F (2017) Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Current Opinion in Microbiology* 37: 67-78; doi: 10.1016/j.mib.2017.05.008
- Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, Topkar VV, Nguyen NT, Zheng Z, Aryee MJ (2015) Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature* 523(7561): 481; doi: 10.1038/nature14592
- Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, Tsai SQ, Nguyen NT, Zheng Z, Joung JK (2016) High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature* 529(7587): 490; doi: 10.1038/nature16526
- Jiang F, Doudna JA (2017) CRISPR-Cas9 structures and mechanisms. *Annual Review of Biophysics* 46: 505-529; doi: 10.1146/annurev-biophys-062215-010822

- Kim E, Koo T, Park SW, Kim D, Kim K, Cho HY, Kim JH (2017) *In vivo* genome editing with a small Cas9 orthologue derived from *Campylobacter jejuni*. Nature Communications 8: 14500; doi: 10.1038/ncomms14500
- Knight SC, Xie L, Deng W, Guglielmi B, Witkowsky LB, Bosanac L, Liu Z (2015) Dynamics of CRISPR-Cas9 genome interrogation in living cells. Science 350(6262): 823-826; doi: 10.1126/science.aac6572
- Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR (2016) Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. Nature 533(7603): 420; doi: 10.1038/nature17946
- Kuscu C, Parlak M, Tufan T, Yang J, Szlachta K, Wei X, Adli M (2017) CRISPR-STOP: gene silencing through base-editing-induced nonsense mutations. Nature Methods 14(7): 710; doi: 10.1038/nmeth.4327
- Li JF, Norville JE, Aach J, McCormack M, Zhang D, Bush J, Sheen J (2013) Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. Nature Biotechnology 31(8): 688; doi: 10.1038/nbt.2654
- Li J, Sun Y, Du J, Zhao Y, Xia L (2017) Generation of targeted point mutations in rice by a modified CRISPR/Cas9 system. Molecular Plant 10(3): 526-529; doi: 10.1038/srep43320
- Liang Z, Chen K, Li T, Zhang Y, Wang Y, Zhao Q, Gao C (2017) Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. Nature Communications 8: 14261; doi: 10.1038/ncomms14261
- Liu D, Chen X, Liu J, Ye J, Guo Z (2012) The rice ERF transcription factor OsERF922 negatively regulates resistance to *Magnaporthe oryzae* and salt tolerance. J Exp Bot, 63: 3899-911; doi: 10.1093/jxb/ers079
- Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, Koonin EV (2015) An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. Nat Rev Microbiol 13(11): 722-736; doi: 10.1038/nrmicro3569
- Mali P, Aach J, Stranges PB, Esvelt KM, Moosburner M, Kosuri S, Church GM (2013) CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. Nature Biotechnology 31(9): 833; doi: 10.1038/nbt.2675
- Marraffini LA, Sontheimer EJ (2008) CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. Science 322(5909): 1843-1845; doi: 10.1126/science.1165771
- Masepohl B, Görlitz K, Böhme H (1996) Long tandemly repeated repetitive (LTRR) sequences in the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression 1307(1): 26-30; doi: 10.1007/s002030050301
- Miao J, Guo D, Zhang J, Huang Q, Qin G, Zhang X (2013) Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. Cell Res 23: 1233-1236; doi: 10.1038/cr.2013.123
- Mojica FJM, Ferrer C, Juez G, Rodriguez Valera F (1995) Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning. Molecular Microbiology 17(1): 85-93; doi: 10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_17010085.x
- Mojica FJ, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J, Almendros C (2009) Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. Microbiology 155: 733-740; doi: 10.1099/mic.0.023960-0
- Nakade S, Yamamoto T, Sakuma T (2017) Cas9, Cpf1 and C2c1/2/3- What's next?. Bioengineered 8(3): 265-273; doi: 10.1080/21655979.2017.1282018
- Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, Jones JD, Kamoun S (2013) Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9-guided endonuclease. Nat Biotechnol 31: 691-693; doi: 10.1038/nbt.2655
- Nekrasov V, Wang C, Win J, Lanz C, Weigel D, Kamoun S (2017) Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant

- tomato by genome deletion. *Sci Rep* 7: 482; doi: 10.1038/s41598-017-00578-x
- Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, Nureki O (2014) Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell* 156(5): 935-949; doi: 10.1016/j.cell.2014.02.001
- Osakabe Y, Osakabe K (2017) Genome editing to improve abiotic stress responses in plants. *Progress Mol Biol Trans Sci* 149: 1877-1173; doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.03.007
- Pattanayak V, Lin S, Guilinger JP, Ma E, Doudna JA, Liu DR (2013) High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nature Biotechnology* 31(9): 839; doi: 10.1038/nbt.2673
- Peng A, Chen S, Lei T, Xu L, He Y (2017) Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene *CsLOB1* promoter in citrus. *Plant Biotechnol J* 15: 1509–19; doi: 10.1111/pbi.12733
- Piatek A, Ali Z, Baazim H, Li L, Abulfaraj A (2015) RNA-guided transcriptional regulation *in planta* via synthetic dCas9-based transcription factors. *Plant Biotechnol J* 13: 578–89; doi: 10.1111/pbi.12284
- Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, Lim WA (2013) Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell* 152(5): 1173-1183; doi: 10.1016/j.cell.2013.02.022
- Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols* 8(11): 2281; doi: 10.1038/nprot.2013.143
- Sander JD, Joung JK (2014) CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature Biotechnology* 32(4): 347; doi: 10.1038/nbt.2842
- Shmakov S, Smargon A, Scott D, Cox D, Pyzocha N, Yan W, Severinov K (2017) Diversity and evolution of class 2 CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology* 15(3): 169; doi: 10.1038/nrmicro.2016.184
- Shan Q, Wang Y, Li J, Zhang Y, Chen K, Liang Z (2013) Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* 31: 686–688; doi: 10.1038/nbt.2650
- Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, Scott DA, Yan WX, Zhang F (2016) Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science* 351(6268): 84-88; doi: 10.1126/science.aad5227
- Steinert J, Schiml S, Puchta H (2016) Homology-based double-strand break-induced genome engineering in plants. *Plant Cell Reports* 35(7): 1429-1438; doi: 10.1007/s00299-016-1981-3
- Sternberg SH, Redding S, Jinek M, Greene EC, Doudna JA (2014) DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature* 507(7490): 62; doi: 10.1038/nature13011
- Svitashev S, Schwartz C, Lenderts B, Young JK, Cigan AM (2016) Genome editing in maize directed by CRISPR–Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nature Communications* 7: 13274; doi: 10.1038/ncomms13274
- Tang L, Mao B, Li Y, Lv Q, Zhang L, Zhao B (2017) Knockout of *OsNramp5* using the CRISPR/Cas9 system produces low Cd-accumulating indica rice without compromising yield. *Scientific Reports* (7): 14438; doi: 10.1038/s41598-017-14832-9
- Tsai SQ, Wyvekens N, Khayter C, Foden JA, Thapar V, Reyon D, Joung JK (2014) Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nature Biotechnology* 32(6): 569; doi: 10.1038/nbt.2908
- van der Oost J, Westra ER, Jackson RN, Wiedenheft B (2014) Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 12: 479–492; doi: 10.1038/nrmicro3279
- van Schie CCN, Takken FLW (2014) Susceptibility Genes 101: How to Be a Good Host. *Annu Rev Phytopathol* 52: 551–581; doi: 10.1146/annurev-phyto-102313-045854
- Vouillot L, Thélie A, Pollet N (2015) Comparison of T7E1 and surveyor mismatch cleavage

- assays to detect mutations triggered by engineered nucleases. *G3 Genes, Genomes, Genetics* 5(3): 407-415; doi: 10.1534/g3.114.015834
- Waltz E (2016) Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation. *Nature News* 532(7599): 293; doi: 10.1038/nature.2016.19754
- Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C (2014) Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol* 32: 947-951; doi: 10.1038/nbt.2969
- Wang F, Wang C, Liu P, Lei C, Hao W, Gao Y, Zhao K (2016) Enhanced rice blast resistance by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the ERF transcription factor gene *OsERF922*. *PLoS One* 11(4): e0154027; doi: 10.1371/journal.pone.0154027
- Wang M, Lu Y, Botella JR, Mao Y, Hua K, Zhu JK (2017) Gene targeting by homology-directed repair in rice using a geminivirus-based CRISPR/Cas9 system. *Mol Plant* 10: 1007-10; doi: 10.1016/j.molp.2017.03.002
- Woo JW, Kim J, Kwon SI, Corvalán C, Cho SW, Kim H, Kim JS (2015) DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nature biotechnology* 33(11): 1162; doi: 10.1038/nbt.3389
- Xie K, Yang Y (2013) RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Mol Plant* 6: 1975-1983; doi: 10.1093/mp/sst119
- Yamano T, Nishimasu H, Zetsche B, Hirano H, Slaymaker IM, Li Y, Ishitani R (2016) Crystal structure of Cpf1 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell* 165(4): 949-962; doi: 10.1016/j.cell.2016.04.003
- Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, Volz SE, Joung J, van der Oost J, Regev A (2015) Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell* 163: 759-771; doi: 10.1016/j.cell.2015.09.038
- Zischewski J, Fischer R, Bortesi L (2017) Detection of on-target and off-target mutations generated by CRISPR/Cas9 and other sequence-specific nucleases. *Biotechnology Advances* 35(1): 95-104; doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.12.003

Recibido: 06-02-2018

Aceptado: 25-05-2018