

Aplicaciones y perspectivas de la edición génica de plantas mediante CRISPR-Cas9

Applications and perspectives of plant gene editing using CRISPR-Cas9

Juan Carlos Salerno¹, Mariana Virginia Kandús¹, Natacha Salomé Lima², Florencia Paula González Pla³, Arturo Prada⁴, David Almorza⁵ y Juan Jorge Michel Fariña⁶

1. INTA; Universidad de Morón (UM); USAL (Argentina). 2. CONICET-UBA. (Argentina).
3. Investigadora doctoral UBACyT. (Argentina). 4. Facultad de Medicina. Universidad de Cádiz (España).
5. Facultad de Ciencias del Trabajo. Universidad de Cádiz (España).
6. Instituto de Investigaciones Psicológicas, UBA. (Argentina)

Manuscrito recibido: 7 de julio de 2021; aceptado para publicación: 4 de julio de 2022

Autor de Contacto: Dr. Juan Carlos Salerno. Escuela Superior de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Morón, Machado 914, (1708) Morón, Prov. de Bs. As., República Argentina. E-mail: salernojc@hotmail.com

Resumen

Los avances en materia de genética y biotecnología, introducen una dimensión novedosa en la utilización de herramientas de edición génica en plantas. En el presente trabajo se relevaron 164 publicaciones científicas que aplicaron CRISPR-Cas9 en el mejoramiento genético vegetal desde 2013 hasta 2020. En la mayor parte de los trabajos publicados se modificaron los siguientes cultivos: arroz, tomate, *Arabidopsis thaliana*, *Brassica sp.*, maíz, soja, tabaco, trigo y papa. Los caracteres modificados mediante CRISPR-Cas9 fueron, en orden de importancia: (i) tolerancia a estreses bióticos, (ii) aumento de la calidad y valor nutricional, (iii) mejoras en los componentes de rendimiento, arquitectura de planta y longitud de ciclo, (iv) tolerancia a estreses abióticos y (v) tolerancia a herbicidas. Los resultados confirman que los avances son vertiginosos y que la técnica es promisoriosa, sin embargo, es necesario un enfoque multidisciplinario que contemple, además, la percepción pública, lo cual resultará beneficioso para productores, consumidores y ambiente.

Palabras clave: genética, fitomejoramiento, edición génica, CRISPR-Cas9.

Abstract

Advances in genetics and biotechnology introduce a novel dimension in the use of gene editing tools in plants. In the present work, 164 scientific publications that applied CRISPR-Cas9 in plant genetic improvement from 2013 to 2020 were surveyed. In most of the published works, the following crops were modified: rice, tomato, Arabidopsis thaliana, Brassica

sp., corn, soybeans, tobacco, wheat and potatoes. The traits modified by CRISPR-Cas9 were, in order of importance: (i) tolerance to biotic stresses, (ii) increased quality and nutritional value, (iii) improvements in yield components, plant architecture and cycle length, (iv) tolerance to abiotic stresses and (v) tolerance to herbicides. The results confirm that the advances are vertiginous and that the technique is promising, however, a multidisciplinary approach is necessary that also contemplates public perception, which will be beneficial for producers, consumers and the environment.

Key words: genetics, plant breeding, gene editing, CRISPR-Cas9.

DOI: <http://doi.org/10.34073/285>

INTRODUCCIÓN

La selección de genotipos superiores depende de la existencia de diversidad genética. La variabilidad genética natural generada a lo largo de la evolución como producto de mutaciones, poliploidización y recombinación genética ha sido aprovechada por los programas de mejoramiento genético con el objetivo de generar materiales adaptados a la producción agrícola. Sin embargo, en algunos cultivos esta variabilidad se ha ido reduciendo como consecuencia inevitable de la selección de individuos con características favorables. Distintas tecnologías han posibilitado la reintroducción de variabilidad a partir de cruzamientos (intra- o inter-específicos e inter-genéricos), la inducción de mutaciones y, más recientemente, la ingeniería genética (Feingold et al., 2018). En los últimos años, el desarrollo de los métodos de secuenciación masiva ha permitido conocer los genomas completos de muchos cultivos. Esta información permite combinar la metodología de mejora convencional con herramientas moleculares y acelerar los procesos de selección en los materiales generados. Además, la ingeniería genética abrió la posibilidad de superar las barreras a la hibridación para incorporar genes provenientes de cualquier organismo, incluso de diferentes reinos, generando organismos genéticamente modificados (OGM) también denominados transgénicos. Las dos principales líneas de mejora de cultivos se han centrado en la obtención de plantas tolerantes a herbicidas y plantas resistentes a insectos. Desafortunadamente, esta técnica no ha rendido todo su potencial. Probablemente, los principales factores que pueden explicar este hecho son: la existencia

de genotipos o especies recalcitrantes para ser transformados o regenerados in vitro, la aleatorización en el genoma del sitio y el número de copias de los transgenes, con efectos de posición impredecibles, la limitación en los caracteres (“traits”) objeto de la transformación difundidos para su uso (principalmente, tolerancia a herbicidas y a insectos), y el estricto, largo y costoso proceso de desregulación para habilitar la comercialización de OGM (Feingold et al., 2018). Una exhaustiva revisión de estudios científicos publicados durante estos años no ha encontrado ninguna evidencia de que las variedades obtenidas mediante ingeniería genética supongan un riesgo para la salud o para el medio ambiente mayor que las variedades obtenidas por mejora convencional (NAS, 2016). Sin embargo, a pesar de los estrictos requerimientos regulatorios, los OGM no han podido evitar una percepción pública negativa.

La edición génica (EG) posee el potencial de realizar modificaciones en la secuencia de ADN dirigidas a genes específicos para alterar su expresión (silenciarlos o sobreexpresarlos), reemplazar alelos (introduciendo alelos favorables) o introducir transgenes en sitios específicos del genoma. En los primeros dos casos, la EG no incorpora secuencias foráneas de ADN por lo que los productos desarrollados por EG son indistinguibles de los generados por mejoramiento convencional (Feingold et al., 2018). Los primeros mecanismos de EG consistían en nucleasas (enzimas de restricción tipo II): meganucleasas, nucleasas de dedos de zinc (ZFN, zinc-finger nucleases) y nucleasas tipo activadores de transcripción (TALEN, transcription activator-like ef-

fector-based nucleases), que realizan cortes en la doble cadena de ADN. A partir del año 2012, Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna, publicaron un artículo en la revista *Science* en el que se presentó el sistema CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, repeticiones palindrómicas cortas interespaciadas regularmente agrupadas) y Cas (CRISPR associated, nucleasa asociada a CRISPR) “programable”, que servía para cortar cualquier cadena de ADN *in vitro* (Jinek et al., 2012; Charpentier & Doudna, 2013). La tecnología CRISPR-Cas9 presenta enormes ventajas sobre los otros sistemas de edición génica, debido a su versatilidad, sencillez, bajo costo, y porque permite editar varias regiones del genoma al mismo tiempo, utilizando varios ARN “guías” que dirigen a la nucleasa Cas9 a distintas partes del ADN.

MATERIAL Y MÉTODO

En el presente trabajo se relevaron 164 publicaciones científicas que aplicaron CRISPR-Cas9 en el mejoramiento genético de plantas desde 2013 hasta 2020. Posteriormente se clasificaron según: (i) cultivo y (ii) tipo de carácter modificado mediante CRISPR-Cas9.

RESULTADOS

La tecnología CRISPR-Cas9 se ha usado extensamente para generar plantas resistentes a estreses bióticos y abióticos en cereales como maíz, arroz y trigo; hortalizas (tomate, papa, mandioca, lechuga, pepino y sandía) soja, algodón, lino, citrus, entre otros (Chen et al. 2019).

El “knockout” de genes se refiere a eliminar genes que confieren caracteres indeseables a los cultivos. Los caracteres que se pueden mejorar mediante esta estrategia son: rendimiento, calidad, resistencia a factores bióticos y abióticos, entre otros.

Si bien el rendimiento es un carácter complejo y que depende de muchos factores, se pueden eliminar genes reguladores que afectan negativamente a los componentes del rendimiento, como: número de granos, tamaño del grano, peso del grano, tamaño de panoja y número de macollos, demostrando que CRISPR-Cas9 es una herramienta efectiva para mejorar caracteres asociados con el rendimiento (Li et al., 2016a; Li et al., 2016c; Liu et al., 2017; Lu et al., 2018b; Xu et al., 2016; Zhang et al., 2016; Zhang et al., 2018c). Sin

embargo, debido a que los caracteres relacionados con el rendimiento son controlados por QTLs (*Quantitative Trait Loci*), la eliminación de factores individuales puede no ser suficiente para incrementar los rendimientos a campo (Chen et al., 2019).

La edición génica ha mejorado la calidad a través de la modificación en el contenido de almidón, valor nutricional y calidad de almacenamiento en los cultivos. Ej: arroz con bajo contenido de amilosa, maíz ceroso, arroz con alta amilosa, mejoras en la fragancia del arroz (Ma et al., 2015; Sun et al., 2017; Waltz, 2016; Zhang et al., 2018b). Se ha obtenido trigo con menor contenido de gluten (Sanchez-León et al., 2018), semillas con alto contenido de ácido oleico en *Camelina sativa* (Jiang et al., 2017; Morineau et al., 2017) y en *Brassica napus* (Okuzaki et al., 2018), tomate con mayor duración post cosecha (Ito et al., 2015; Li et al., 2018a) mayor contenido de licopeno en tomate (Li et al., 2018c) o mayor contenido de ácido γ -aminobutírico (Li et al., 2018b; Nonaka et al., 2017), papa con niveles reducidos de glicoalcaloides tóxicos (Nakayasu et al., 2018).

En muchas especies se ha obtenido resistencia a stress biótico (hongos, virus, bacterias e insectos) a través del “knockout” de genes mediante CRISPR-Cas9, como la resistencia a moho polvoriento en trigo (Wang et al., 2014), y tomate (Nekrasov et al., 2017), la resistencia a *Magnaporthe oryzae* (hongo), *Xanthomonas oryzae* (bacteria) y enfermedad de tungro (virus) en arroz (Macovei et al., 2018; Wang et al., 2016; Zhou et al., 2015), la resistencia a virus del mosaico en pepino (Chandrasekaran et al., 2016), la resistencia a virus del enrollamiento de las hojas en algodón (Iqbal et al., 2016) y la resistencia a hemípteros y orugas del tallo en arroz (Lu et al., 2018a).

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 & Takken, 2014). Así, Nekrasov et al. (2017) editaron el gen *SIM101* de tomate mediante el uso de dos sgARN. Las plantas modificadas de la generación T0 mostraron deleciones de 48 pb mientras que su progenie mostró resistencia a *Oidium neolycopersici* sin afectar la morfología de la planta y rendimiento del fruto.

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 al hongo *Phytophthora capsici* LT1534. 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.). Por otro lado, Peng *et al.* (2017) modificaron el promotor del gen de susceptibilidad *CsLOB1* y aumentaron la resistencia a *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

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. Mediante CRISPR-Cas se mejoró la adaptación del cultivo de arroz a la toxicidad del suelo; en este sentido, se obtuvieron líneas con bajos niveles de metales pesados (Nieves-Cordones *et al.*, 2017; Tang *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017) y la tolerancia a altas temperaturas y al brotado (Miao *et al.* 2018).

En relación con la eficiencia en la producción de híbridos, la edición génica permitió la obtención de líneas androestériles en arroz (Li *et al.*, 2016b; Zhou *et al.*, 2016) en maíz (Li *et al.*, 2017a) y en trigo (Singh *et al.* 2018). También se obtuvieron otros caracteres relacionados con la producción de híbridos: obtención de haploides (Dong *et al.*, 2018; Yao *et al.*, 2018), acortamiento del ciclo del cultivo (Li *et al.*, 2017b) y generar plantas auto-compatibles en papa diploide (Ye *et al.*, 2018).

Muchos caracteres agronómicos pueden modificarse a través de sustituciones de nucleótidos individuales, generando cambios en la expresión génica o nuevas funciones a un determinado gen. Mediante esta estrategia se obtuvo mayor tolerancia a sequía en líneas de maíz (Shi *et al.* 2017), mayor vida post cosecha en tomate (Yu *et al.*, 2017), mayor contenido de antocianinas en tomate (Čermák, *et al.*, 2015), resistencia a herbicidas de la familia sulfonilureas en soja (Li *et al.*, 2015), maíz (Svitashev *et al.*, 2015, 2016) y arroz (Butt *et al.*, 2017; Endo *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2016), resistencia al herbicida glifosato en lino (Sauer *et al.*, 2016), mandioca (Hummel *et al.*, 2017) y arroz (Li *et al.* 2016c).

Mediante mecanismos de edición de bases se obtuvieron plantas resistentes a herbicidas del grupo de las sulfonilureas o imidazolinonas en arroz (Shimatani *et al.*, 2017), trigo (Zong *et al.*, 2018), *Arabidopsis* (Chen *et al.*, 2017) y sandía (Tian *et al.*, 2018), y resistencia a haloxifop-R- metil en arroz (Li *et al.*, 2018d).

Los procesos de expresión génica están bajo control de series de elementos regulatorios “cis” y de promotores que pueden ser modificados mediante edición génica (Peng *et al.*, 2017; Piatek *et al.*, 2015; Rodríguez-Leal *et al.*, 2017). A nivel traduccional, también pueden alterarse elementos regulatorios “cis” para modular la expresión proteica, por ejemplo, se incrementó el contenido de ascorbato en hojas de *Lactuca sativa* (Zhang *et al.*, 2018a).

Debido a que CRISPR-Cas provee un mecanismo de defensa basado en el clivaje de plásmidos, de ADN virus o de ARN virus que invaden bacterias, esta estrategia también puede usarse para conferir resistencia a virus en plantas (Chen *et al.*, 2019).

Disponer de “mutant libraries” es una herramienta de alto valor para la genómica funcional y el mejoramiento genético. Esta técnica se basaba en mutaciones inducidas, lo cual posee la desventaja de un mayor número de generaciones requeridas para estabilizar a los genotipos y de una mayor cantidad de tiempo y trabajo para determinar la relación entre genotipo y fenotipo. Esta tarea puede simplificarse a través de CRISPR-Cas; en este sentido, se generaron “mutant libraries” a través de “knockout” cubriendo la mayor parte del genoma en arroz (Lu *et al.*, 2017; Meng *et al.*, 2017) y también en tomate (Jacobs *et al.*, 2017).

En las Figs. 1 y 2 se grafican los resultados obtenidos a partir del análisis y clasificación de las publicaciones científicas.

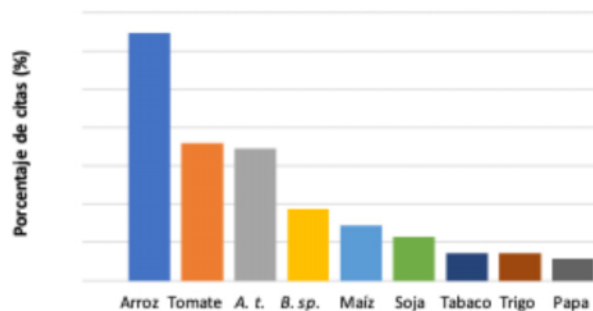


Figura 1. Porcentaje de citas de cada cultivo modificado con CRISPR-Cas9. A. t. = *Arabidopsis thaliana*, B. sp = *Brassica sp.*



Figura 2. Porcentaje de citas según carácter modificado mediante CRISPR-Cas9.

DISCUSIÓN

En este trabajo se detectaron los avances logrados en edición génica utilizando la herramienta CRISPR-Cas 9. Se relevó un alto número de citas en cultivos como arroz, Arabidopsis, tomate, maíz, soja, trigo, *Brassica sp.*, papa y alfalfa, y también en tabaco, sorgo, pepino, lechuga, cebada, caña de azúcar, batata, mandioca, *Lotus*, *Citrus*, sandía, banana, uva, lino y algodón, pero en menor medida. Los caracteres modificados mediante CRISPR-Cas9 fueron, en orden de importancia: tolerancia a estreses bióticos, aumento de la calidad y valor nutricional, mejoras en los componentes de rendimiento, arquitectura de planta y longitud de ciclo, tolerancia a estreses abióticos y tolerancia a herbicidas. No se detectaron casos controversiales desde el punto de vista ético, es decir que las modificaciones con CRISPR-Cas9 en plantas, no presentaron riesgos para el medio ambiente o la salud humana. Además, en relación con el marco regulatorio, es probable que la aprobación de estos productos en nuestro país sea más fácil y menos costosa en comparación con los OGM. Los resultados confirman que los avances son vertiginosos y que la técnica es promisoriosa, sin embargo, es necesario un enfoque multidisciplinario que contemple, además, la percepción pública, lo cual resultará beneficioso para productores, consumidores y ambiente.

CONCLUSIONES

El uso de CRISPR-Cas9 permite moldear al reino vegetal como nunca antes se había logrado, con el fin de mejorar el bienestar global. Por ejemplo, el desarrollo de genotipos resistentes a insectos o enfermedades presenta un amplio beneficio para la humanidad, reduciendo o evitando el uso de plaguicidas y agroquímicos.

Los avances vertiginosos en materia de Genética y Biotecnología, y en particular las cuestiones bioéticas referidas a CRISPR-Cas9 sólo pueden ser analizadas en su complejidad a partir de un modelo integrado que permita una articulación entre distintas ciencias como la Genética y las ciencias conjeturales como la Filosofía y Psicología.

AGRADECIMIENTOS

A la secretaria de Ciencia y Técnica de la Universidad de Morón, por la aprobación del proyecto TÍTULO: “CRISPR-Cas 9 y otros avances en genética y biotecnología: delimitación ética y desarrollo de protocolos de intervención”, CÓDIGO: DC/18 N° 80020190100017UM, perteneciente a los proyectos de investigación SIGEVA UM de diálogo entre las Ciencias 2019. A la Ing. Agr. MSc. Dr. Adriana De Caro, Directora del Área de Ciencias Agroalimentarias, Escuela Superior de Ingeniería, Informática y Ciencias Agroalimentarias, Universidad de Morón, por su constante empatía y apoyo recibido. Al Sr. Decano de ESIICA, Ing. Agr. Antonio Angrisani por habernos incentivado siempre a presentar este proyecto y colaborado en el armado del equipo de trabajo interdisciplinario con éxito que se observa en el informe final. A todo el equipo que trabajó desinteresadamente e intensamente a pesar de las contingencias de pandemia que se está viviendo.

BIBLIOGRAFIA

- Butt H, Eid A, Ali Z, Atia MAM, Morad, M, Mokhtar, NH, Lee, CM3, Bao, G. and Mahfouz, MM. 2017. Efficient CRISPR/Cas9-mediated genome editing using a chimeric single-guide RNA molecule. *Front. Plant Sci.* 8:1441
- Čermák T, Baltes NJ, Čegan R, Zhang Y, Voytas DF. 2015. High-frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome Biol.* 16:232
- Chandrasekaran J, Brumin M, Wolf D, Leibman D, Klap C, et al. 2016. Development of broad virus resistance in non-

transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Mol. Plant Pathol.* 17:1140–53

- Chen K, Wang Y, Zhang R, Zhang H, Gao C. 2019. CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2019. 70:667–97. The Annual Review of Plant Biology is online at plant.annualreviews.org. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant->
- Chen YY, Wang ZP, Ni HW, Xu Y, Chen QJ, Jiang LJ. 2017. CRISPR/Cas9-mediated base-editing system efficiently generates gain-of-function mutations in *Arabidopsis*. *Sci. China Life Sci.* 60:520–23
- e Toledo DP, Brail Q, Dahlbeck D, Staskawicz BJ. 2016. CRISPR-Cas9 mediated mutagenesis of a DMR6 ortholog in tomato confers broadspectrum disease resistance. *BioRxiv* 064824:0; doi: 10.1101/064824
- Dong L, Li L, Liu C, Shuaifeng G, et al. 2018. Genome editing and double fluorescence proteins enable robust maternal haploid induction and identification in maize. *Mol. Plant* 11:1214–17
- Endo M, Mikami M, Toki S. 2016. Biallelic gene targeting in rice. *Plant Physiol.* 170:667–77.
- FAO: El estado mundial de la agricultura y la alimentación. Enseñanza de los últimos cincuenta años (2000).
- FAO: El estado mundial de la agricultura y la alimentación. Análisis mundial: situación agrícola y alimentaria en el África subsahariana. La mujer en el desarrollo agrícola (1983).
- FAO, FIDA y PMA: www.fao.org. unwomen.org/news/stories/2012. (2012).
- Feingold, S.E.; Bonnacarrère, V.; Nepomuceno, A.; Hinrichsen, P.; Cardozo Tellez, L.; Molinari, H.; Barba, P.; Eyherabide, G.; Ceretta, S.; Dujack, C. 2018. Edición génica: una oportunidad para la región. *RIA* 44 (3) : 424-427. <http://ria.inta.gob.ar/contenido/ria-44-no-3-diciembre-2018>
- Gómez Mena, C. 2019. Plantas a la carta. La edición de genomas para la mejora vegetal. *Mètode Science Studies Journal* (2020). Universitat de València. DOI: 10.7203/mètode.11.15507
- Iqbal Z, Sattar MN, Shafiq M. 2016. CRISPR/Cas9: a tool to circumscribe cotton leaf curl disease. *Front. Plant Sci.* 7:475
- Ito Y, Nishizawa-Yokoi A, Endo M, Mikami M, Toki S. 2015. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the RIN locus that regulates tomato fruit ripening. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 467:76–82
- Jacobs TB, Zhang N, Patel D, Martin GB. 2017. Generation of a collection of mutant tomato lines using pooled CRISPR libraries. *Plant Physiol.* 174:2023–37 49.
- Jiang WZ, Henry IM, Lynagh PG, Comai L, Cahoon EB, Weeks DP. 2017. Significant enhancement of fatty acid composition in seeds of the allohexaploid, *Camelina sativa*, using CRISPR/Cas9 gene editing. *Plant Biotechnol. J.* 15:648–57
- Li C, Zong Y, Wang Y, Jin S, Zhang D, et al. 2018d. Expanded base editing in rice and wheat using a Cas9-adenosine deaminase fusion. *Genome Biol.* 19:59
- Li J, Meng X, Zong Y, Chen K, Zhang H, et al. 2016d. Gene replacements and insertions in rice by intron targeting using CRISPR-Cas9. *Nat. Plants* 2:16139
- Li J, Zhang H, Si X, Tian Y, Chen K, et al. 2017a. Generation of thermosensitive male-sterile maize by targeted knockout of the *ZmTMS5* gene. *J. Genet. Genom.* 44:465–68
- Li Q, Zhang D, Chen M, Liang W, Wei J, et al. 2016b. Development of japonica photo-sensitive genic male sterile rice lines by editing carbon starved anther using CRISPR/Cas9. *J. Genet. Genom.* 43:415–19
- Li R, Fu D, Zhu B, Luo Y, Zhu H. 2018a. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of *lncRNA1459* alters tomato fruit ripening. *Plant J.* 94:513–24
- Li R, Li R, Li X, Fu D, Zhu B, et al. 2018b. Multiplexed CRISPR/Cas9-mediated metabolic engineering of γ -aminobutyric acid levels in *Solanum lycopersicum*. *Plant Biotechnol. J.* 16:415–27
- Li S, Gao F, Xie K, Zeng X, Cao Y, et al. 2016c. The *OsmiR396c-OsGRF4-OsGIF1* regulatory module determines grain size and yield in rice. *Plant Biotechnol. J.* 14:2134–46
- Li X, Wang Y, Chen S, Tian H, Fu D, et al. 2018c. Lycopene is enriched in tomato fruit by CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing. *Front. Plant Sci.* 9:559
- Li X, Zhou W, Ren Y, Tian X, Lv T, et al. 2017b. High-efficiency breeding of early-maturing rice cultivars via CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *J. Genet. Genom.* 44:175–78
- Li Z, Liu ZB, Xing A, Moon BP, Koellhoffer JP, et al. 2015. Cas9-guide RNA directed genome editing in soybean. *Plant Physiol.* 169:960–70
- Liu J, Chen J, Zheng X, Wu F, Lin Q, et al. 2017. *GW5* acts

in the brassinosteroid signalling pathway to regulate grain width and weight in rice. *Nat. Plants* 3:17043

- Luet HP, Luo T, Fu HW, Wang L, Tan YY, et al. 2018a. Resistance of rice to insect pests mediated by suppression of serotonin biosynthesis. *Nat. Plants* 4:338–44.
- Lu K, Wu B, Wang J, Zhu W, Nie H, et al. 2018b. Blocking amino acid transporter OsAAP3 improves grain yield by promoting outgrowth buds and increasing tiller number in rice. *Plant Biotechnol. J.* 16:1710–22
- Lu Y, Ye X, Guo R, Huang J, Wang W, et al. 2017. Genome-wide targeted mutagenesis in rice using the CRISPR/Cas9 system. *Mol. Plant* 10:1242–45
- Ma X, Zhang Q, Zhu Q, Liu W, Chen Y, et al. 2015. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Mol. Plant* 8:1274–84
- Macovei A, Sevilla NR, Cantos C, Jonson GB, Slamet-Loedin I, et al. 2018. Novel alleles of rice eIF4G generated by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis confer resistance to Rice tungro spherical virus. *Plant Biotechnol. J.* 16:1918–27
- Meng X, Yu H, Zhang Y, Zhuang F, Song X, et al. 2017. Construction of a genome-wide mutant library in rice using CRISPR/Cas9. *Mol. Plant* 10:1238–41
- Miao C, Xiao L, Hua K, Zou C, Zhao Y, et al. 2018. Mutations in a subfamily of abscisic acid receptor genes promote rice growth and productivity. *PNAS* 115:6058–63
- Ministerio de Agroindustria 09/04/2019. https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/prensa/index.php?accion=noticia&id_info=1904091310 59
- Morineau C, Bellec Y, Tellier F, Gissot L, Kelemen Z, et al. 2017. Selective gene dosage by CRISPR/Cas9 genome editing in hexaploid *Camelina sativa*. *Plant Biotechnol. J.* 15:729–39
- Nakayasu M, Akiyama R, Lee HJ, Osakabe K, Osakabe Y, et al. 2018. Generation of α -solanine-free hairy roots of potato by CRISPR/Cas9 mediated genome editing of the St16DOX gene. *Plant Physiol. Biochem.* 131:70–77
- NAS. National academies of sciences, engineering and medicine. 2016. Gene drive research in non-human organisms: recommendations for responsible conduct. <http://nas-sites.org/gene-drives/>
- 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.* 7:48
- Nieves-Cordones M, Mohamed S, Tanoi K, Kobayashi NI, Takagi K, et al. 2017. Production of low- Cs^+ rice plants by inactivation of the K^+ transporter OsHAK1 with the CRISPR-Cas system. *Plant J.* 92:43–56
- Nonaka S, Arai C, Takayama M, Matsukura C, Ezura H. 2017. Efficient increase of γ -aminobutyric acid (GABA) content in tomato fruits by targeted mutagenesis. *Sci Rep.* 7:7057
- Okuzaki A, Ogawa T, Koizuka C, Kaneko K, Inaba M, et al. 2018. CRISPR/Cas9-mediated
- Peng A, Chen S, Lei T, Xu L, He Y, et al. 2017. Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene CsLOB1 promoter in citrus. *Plant Biotechnol. J.* 15:1509–19
- Piatek A, Ali Z, Baazim H, Li L, Abulfaraj A, et al. 2015. RNA-guided transcriptional regulation in plants via synthetic dCas9-based transcription factors. *Plant Biotechnol. J.* 13:578–89.
- Rodríguez-Leal D, Lemmon ZH, Man J, Bartlett ME, Lippman ZB. 2017. Engineering quantitative trait variation for crop improvement by genome editing. *Cell* 171:470–80
- Sanchez-León S, Gil-Humanes J, Ozuna CV, Giménez MJ, Sousa C, et al. 2018. Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol. J.* 16:902–10.
- Sauer NJ, Narvaez-Vasquez J, Mozurk J, Miller RB, Warburg ZJ, et al. 2016. Oligonucleotide-mediated genome editing provides precision and function to engineered nucleases and antibiotics in plants. *Plant Physiol.* 170:1917–28
- Shi J, Gao H, Wang H, Lafitte HR, Archibald RL, et al. 2017. ARGOS8 variants generated by CRISPR/Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnol. J.* 15:207–16
- Singh M, Kumar M, Albertsen MC, Young JK, Cigan AM. 2018. Concurrent modifications in the three homeologs of Ms45 gene with CRISPR-Cas9 lead to rapid generation of male sterile bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Mol. Biol.* 97:371–83
- Sun Y, Zhang X, Wu C, He Y, Ma Y, et al. 2016. Engineering herbicide-resistant rice plants through CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination of acetolactate synthase. *Mol. Plant* 9:628–31
- Sun Y, Jiao G, Liu Z, Zhang X, Li J, et al. 2017. Generation of high-amylose rice through CRISPR/Cas9-mediated targeted

mutagenesis of starch branching enzymes. *Front. Plant Sci.* 8:1298

- Svitashv S, Young JK, Schwartz C, Gao H, Falco SC, Cigan AM. 2015. Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA. *Plant Physiol.* 169:931–45
- Svitashv S, Schwartz C, Lenderts B, Young JK, Mark Cigan A. 2016. Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat. Commun.* 7:13274
- Tang L, Mao B, Li Y, Lv Q, Zhang L, et al. 2017. Knockout of OsNramp5 using the CRISPR/Cas9 system produces low Cd-accumulating indica rice without compromising yield. *Sci. Rep.* 7:14438
- Tian S, Jiang L, Cui X, Zhang J, Guo S, et al. 2018. Engineering herbicide-resistant watermelon variety through CRISPR/Cas9-mediated base-editing. *Plant Cell Rep.* 37:1353–56.
- 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
- Waltz, E. 2016. CRISPR-edited crops free to enter market, skip regulation. *Nature Biotechnology* volume 34, page582
- Wang FZ, Chen MX, Yu LJ, Xie LJ, Yuan LB, et al. 2017. OsARM1, an R2R3 MYB transcription factor, is involved in regulation of the response to arsenic stress in rice. *Front. Plant Sci.* 8:1868
- Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, et al. 2014. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat. Biotechnol.* 32:947–51
- Xu R, Yang Y, Qin R, Li H, Qiu C, et al. 2016. Rapid improvement of grain weight via highly efficient CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing in rice. *J. Genet. Genom.* 43:529–32.

- Yao L, Zhang Y, Liu C, Liu Y, Wang Y, et al. 2018. OsMATL mutation induces haploid seed formation in indica rice. *Nat. Plants* 4:530–33
- Ye M, Peng Z, Tang D, Yang Z, Li D, et al. 2018. Generation of self-compatible diploid potato by knockout of S-RNase. *Nat. Plants* 4:651–54
- Yu QH, Wang B, Li N, Tang Y, Yang S, et al. 2017. CRISPR/Cas9-induced targeted mutagenesis and gene replacement to generate long-shelf life tomato lines. *Sci. Rep.* 7:11874
- Zhang H, Si X, Ji X, Fan R, Liu J, et al. 2018a. Genome editing of upstream open reading frames enables translational control in plants. *Nat. Biotechnol.* 36:894–98
- Zhang J, Zhang H, Botella JR, Zhu JK. 2018b. Generation of new glutinous rice by CRISPR/Cas9- targeted mutagenesis of the waxy gene in elite rice varieties. *J. Integr. Plant Biol.* 60:369–75
- Zhang Y, Li D, Zhang D, Zhao X, Cao X, et al. 2018c. Analysis of the functions of TaGW2 homoeologs in wheat grain weight and protein content traits. *Plant J.* 94:857–66
- Zhang Y, Liang Z, Zong Y, Wang Y, Liu J, et al. 2016. Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. *Nat. Commun.* 7:12617
- Zhou J, Peng Z, Long J, Sosso D, Liu B, et al. 2015. Gene targeting by the TAL effector PthXo2 reveals cryptic resistance gene for bacterial blight of rice. *Plant J.* 82:632–43
- Zong Y, Song Q, Li C, Jin S, Zhang D, et al. 2018. Efficient C-to-T base editing in plants using a fusion of nCas9 and human APOBEC3A. *Nat. Biotechnol.* 36:950–53.