

PLANTAS EDITADAS EN EL GENOMA

GENOME-EDITED PLANTS

Lisset **Herrera-Isidron**¹, Eliana **Valencia-Lozano**², José L. **Cabrera-Ponce**^{3*}

¹Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería Campus Guanajuato (UPIIG). Instituto Politécnico Nacional. Av. Mineral de Valenciana 200, 36275, Puerto Interior, Silao de la Victoria, Guanajuato, México. ²Departamento de Biotecnología y Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Irapuato, 36824, Irapuato, Guanajuato, México (lherrera@ipn.mx). ^{2,3}Departamento de Ingeniería Genética, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Irapuato, 36824, Irapuato, Guanajuato, México. (e.valencial@hotmail.com, jlcabre@yahoo.com.mx)

RESUMEN

Las Plantas Editadas en el Genoma (PEG) se obtienen mediante técnicas de ingeniería genética en las cuales al ADN se le pueden insertar, eliminar, modificar o reemplazar secuencias en el genoma de la planta. A diferencia de las técnicas de ingeniería anteriores en las cuales se insertaba material genético al azar en el genoma (plantas transgénicas), en las PEG se realizan una o varias modificaciones puntuales estables en sitios específicos. La modificación debe ser heredable, y la secuencia transgénica se elimina en la segregación. En los cultivos propagados en forma vegetativa, se han encontrado alternativas moleculares como el uso de complejos de ribonucleoproteínas para eliminar las secuencias foráneas en las primeras plantas regeneradas. Las PEG son indistinguibles de las plantas producidas por mutagénesis espontánea, mutagénesis clásica o por introgresión del alelo deseado a través de fitomejoramiento. El futuro de estas tecnologías es prometedor debido a la gran cantidad de estudios ya publicados, y de otros en fase de desarrollo, los cuales buscan soluciones a problemas básicos y prácticos. Las PEG son casi idénticas a las plantas obtenidas por fitomejoramiento y su análisis de riesgo deberá evaluarse en función del producto resultante, en lugar del proceso por el cual se creó. Este tipo de regulación se realizará primero en los Estados Unidos y Canadá.

INTRODUCCIÓN

Domesticación de las plantas

La domesticación de las plantas ha sido una de las grandes innovaciones tecnológicas en la historia de la humanidad, y fue el eje de la revolución neolítica hace 13 000 años en el cual grupos

ABSTRACT

Genome Edited Plants (PEG) are obtained by genetic engineering techniques in which DNA can be inserted, deleted, modified or replaced sequences in the genome of the plant. Unlike previous engineering techniques in which random genetic material was inserted into the genome (transgenic plants), one or several stable point modifications are made to specific sites at PEGs. The modification must be inheritable, and the transgenic sequence is eliminated in segregation. In vegetative propagated crops, molecular alternatives have been found such as the use of ribonucleoprotein complexes to eliminate foreign sequences in the first regenerated plants. PEGs are indistinguishable from plants produced by spontaneous mutagenesis, classical mutagenesis or by introgression of the desired allele through plant breeding. The future of these technologies is promising due to the large number of studies already published, and others that are under development, which seek solutions to basic and practical problems. The PEGs are almost identical to the plants obtained by plant breeding and their risk analysis should be evaluated according to the resulting product, rather than the process that created it. This type of regulation will be done first in the United States and Canada.

INTRODUCTION

Plant domestication

Plant domestication has been one of the great technological innovations in the history of mankind, and it was the mainstay of the Neolithic revolution 13 000 years ago in which groups of human beings converted from nomadic hunters to sedentary agricultural societies, which later generated modern human culture. Domestication produced food sources, artisanal specializations, arts, social

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: enero, 2019. Aprobado: agosto, 2019.

Publicado como ENSAYO en *Agrociencia* 53: 1139-1159. 2019.

de seres humanos se convirtieron de nómadas cazadores a sociedades sedentarias agrícolas, dando lugar a la cultura humana de la actualidad. La domesticación produjo fuentes de alimento, especializaciones artesanales, artes, jerarquías sociales, escritura, urbanización y el origen del estado (Meyer y Purugganan, 2013).

Las especies domesticadas se clasifican en 160 familias taxonómicas, de las cuales 2500 están sujetas a la domesticación y 353 completamente domesticadas. De estas especies, 292 (82.7%) son dicotiledóneas, 58 (16.4%) monocotiledóneas y 3 (0.85%) son gimnospermas, y se usan principalmente como fuente de alimentación (Meyer y Purugganan, 2013). A nivel molecular el proceso de domesticación parece asociarse con mutaciones en los genes involucrados en las redes regulatorias transcripcionales. De una lista de 60 genes reportados en la domesticación o diversificación, 37 (61.55%) son factores de transcripción y 3 (5%) son co-reguladores de la transcripción. Del resto, 14 (23.45%) genes codifican para la síntesis de enzimas y 6 (10%) son transportadores de proteínas y ubiquitina ligasas (Meyer y Purugganan, 2013).

De la lista anterior, 23 genes se relacionan con la domesticación, en el estadio evolutivo 1, en el inicio de la domesticación; 32 genes se involucran en la diversificación, en los estadios 2 y 3, que es el aumento *in situ* de alelos deseables; y 5 genes asociados con la domesticación y con diversificación. El estadio 4 corresponde al cruzamiento deliberado (fitomejoramiento) (Meyer y Purugganan, 2013). Las mutaciones causantes de la evolución de los cultivos tienen un gran rango de efectos. De los 60 genes referidos, las mutaciones sin sentido, los truncados prematuros y otras mutaciones con una función nula, como cambios en el marco de lectura y defectos de empalme, son los tipos predominantes (38 de 60 genes).

Además, están las mutaciones sin sentido u otros tipos de cambios estructurales, las cuales alteran la función de las proteínas (10 de 60 genes) (Meyer y Purugganan, 2013). Esto sugiere a la pérdida de la función de los alelos y a la alteración de la expresión de los genes, como los tipos de cambios funcionales más comunes observados durante la evolución de los cultivos. En este ensayo se brinda una herramienta de conceptos lo cual permita un entendimiento claro y estratégico, para la adopción de nuevas tecnologías aplicadas en la biotecnología de cultivos.

hierarchies, writing, urbanization and the origin of the state (Meyer and Purugganan, 2013).

Domesticated species are classified into 160 taxonomic families, of which 2500 are subject to domestication and 353 completely domesticated. Of these species, 292 (82.7%) are dicotyledonous, 58 (16.4%) monocotyledonous and 3 (0.85%) are gymnosperms and are mainly used as a food source (Meyer and Purugganan, 2013). At the molecular level, the domestication process seems to be associated with mutations in the genes involved in transcriptional regulatory networks. From a list of 60 genes reported in domestication or diversification, 37 (61.55%) are transcription factors and 3 (5%) are co-regulators of transcription. Of the rest, 14 (23.45%) genes code for enzyme synthesis and 6 (10%) are transporters of protein and ubiquitin ligases (Meyer and Purugganan, 2013).

From the previous list, 23 genes are related to domestication, in evolutionary stage 1, the one at the beginning of domestication; 32 genes are involved in diversification, in stages 2 and 3, which is the increase *in situ* of desirable alleles; and 5 genes associated with domestication and diversification. Stage 4 corresponds to deliberate crossing (breeding) (Meyer and Purugganan, 2013). Mutations causing the evolution of crops have a wide range of effects. Of the 60 genes referred to, nonsense mutations, premature truncates and other mutations that lead to zero function, such as changes in the reading frame and splicing defects, are the predominant types (38 of 60 genes).

In addition, there are nonsense mutations or other types of structural changes that alter the function of proteins (10 of 60 genes) (Meyer and Purugganan, 2013). This suggests that both the loss of allele function, and the alteration of gene expression, are the most common types of functional changes observed during crop evolution. This essay provides a tool of concepts that allows a clear and strategic understanding, for the adoption of new technologies applied in crop biotechnology.

PLANT BREEDING

Traditional plant breeding is mainly set up on hybridization between genotypes of the same species with different qualities, which has proven to be slow, is limited to a reduced number of genomes and to

FITOMEJORAMIENTO

El fitomejoramiento tradicional se basa principalmente en la hibridación entre genotipos de la misma especie con diferentes cualidades, el cual ha demostrado ser lento, se limita a un número reducido de genomas y a la restricción de las barreras naturales de cruzamiento entre especies. Gregorio Mendel estableció los principios básicos de la herencia genética. Sus tres leyes: el principio de la uniformidad de los heterocigotos de la primera generación filial, los principios de la segregación, y el principio de la distribución independiente de los alelos, han sido la base del fitomejoramiento desde 1900. Los fitomejoradores han dependido de mutaciones naturales espontáneas para generar nuevos caracteres, lo cual ha sido crítico para el incremento de la variabilidad genética.

Mutagénesis

Además de utilizar la variabilidad genética existente, el fitomejoramiento ha usado la mutagénesis, la cual se define como el proceso por el cual la información genética de un organismo se cambia de una manera estable. Esto ocurre en la naturaleza como resultado de errores en los sistemas de reparación del ADN. El término mutación, del latín *mutare* (cambiar), lo publicó Hugo de Vries en 1901, quien lo definió como “aquellos cambios heredables repentinos en las formas de las plantas (fenotipos), obvios, aparentes e inusuales, y por ello, de interés”. En la actualidad, una mutación es cualquier cambio en la secuencia de nucleótidos del ADN. Cuando afecta a un solo gen se le denomina mutación génica, si involucra la estructura de uno o varios cromosomas se conoce como mutación cromosómica, y cuando se provocan alteraciones en todo el genoma son mutaciones genómicas. Los tipos experimentales de mutagénesis y mutantes se clasifican de la manera descrita a continuación.

Mutagénesis inducida

Esta se logra mediante el uso de mutágenos por radiación o químicos y es un proceso al azar. Los neutrones causan eliminaciones de 300 a 12 000 pb, la irradiación gamma pequeñas eliminaciones (1-10 pb), y los mutágenos químicos como el etil metano sulfonato o EMS, dan como resultado mutaciones

the restriction of natural barriers of crossing between species. Gregor Mendel established the basic principles of genetic inheritance. Its three laws: the principle of uniformity of heterozygous of the first generation of the subsidiary, the principles of segregation, and the principle of independent distribution of alleles, have been the basis of plant breeding since 1900. Plant breeders have depended on natural and spontaneous mutations to generate new characters, which has been critical for the increase of genetic variability.

Mutagenesis

In addition to using existing genetic variability, plant breeding has used mutagenesis, which is defined as the process by which the genetic information of an organism is changed in a stable manner. This occurs in nature as a result of errors in DNA repair systems. The term mutation, from Latin *mutare* (change), was published by Hugo de Vries in 1901, who defined it as “those sudden inheritable changes in the forms of plants (phenotypes) that were obvious, apparent and unusual, and therefore, of interest”. At present, a mutation is any change in the nucleotide sequence of DNA. When it affects a single gene, it is called a gene mutation, if it involves the structure of one or several chromosomes it is known as a chromosomal mutation, and when alterations are caused throughout the genome, they are genomic mutations. Experimental types of mutagenesis and mutants are classified in the manner described below.

Induced mutagenesis

This is achieved by the using radiation or chemical mutagens and is a random process. Neutrons cause deletions of 300 to 12 000 bp, gamma irradiation, small eliminations (1-10 bp), and chemical mutagens such as ethyl methane sulphonate or EMS, result in transition mutations from G/C to A/T (Cabrera-Ponce *et al.*, 2019). Mutagenesis by “heavy ion beam” is superior to other techniques because it causes more localized and simple alterations, and thus creates new varieties without modifying the characteristics of the parental individual (Hirano *et al.*, 2015). It is a standard technique applied to ornamental plants in Japan and in China in rice, spinach, melon, citrics, conifers, etc. (Cabrera-Ponce *et al.*, 2019).

de transición de G/C a A/T (Cabrera-Ponce *et al.*, 2019). La mutagénesis mediante “haz de iones pesados” es superior a las demás técnicas porque causa alteraciones más localizadas y simples, y de esa manera crea nuevas variedades sin modificar las características del individuo parental (Hirano *et al.*, 2015). Es una técnica rutinaria la cual se aplica a plantas ornamentales en Japón y en China en cultivos de arroz, espinaca, melón, cítricos, coníferas, etc. (Cabrera-Ponce *et al.*, 2019).

Estas técnicas han tenido un éxito importante desde hace 70 años, y se han obtenido más de 3200 variedades de más de 200 especies (base de datos de la IAEA/FAO, <http://www-infocris.iaea.org/MVD>). Como resultado, 1825 (57%) mutantes muestran mejores características agronómicas y botánicas, 577 (18%) presentan incrementos en la producción, 321 (10%) tienen mejoras en la calidad nutricional, 200 (6%) en tolerancia a estrés biótico, y 125 (4%) en estrés abiótico (Suprasanna *et al.*, 2015). Las mutantes han tenido un gran impacto económico en todo el mundo y contribuyeron a la ganancia de millones de dólares anuales en las economías de los países involucrados (Cabrera-Ponce *et al.*, 2019). Las investigaciones en mutagénesis han mostrado un gran avance en las últimas décadas debido a los avances alcanzados en la genómica. Nuevos métodos para detectar las variaciones genéticas y la selección de fenotipos mutados se desarrollaron y algunos ejemplos son: TILLing (“Targeted Induced Local Lesions” o Lesiones locales inducidas dirigidas a objetivos en genomas), eco-tilling, ARN de interferencia, mutagénesis por desajuste (*mismatch*) en sitio-específico, recombinación homóloga, genética reversa e inversa vía elementos de transposición, reemplazo genético, adición de genes, modificación de transcriptoma por tratamiento mutagénico, aneuploidía y pérdida de cromosoma uniparental (Cabrera-Ponce *et al.*, 2019).

Mutagénesis insercional

Esta resulta de la inserción de ADN a través de transformación genética o inserción de T-ADN (mutagénesis por inserción del T-ADN), o por la activación de transposones (mutagénesis transposicional). El uso de la biotecnología de las plantas transgénicas ha brindado importantes beneficios económicos desde su inicio. Por ejemplo, el rasgo de resistencia a insectos (RI) ha generado elevados ingresos al mejorar

These techniques have been an important success for 70 years, and more than 3200 varieties of more than 200 species have been obtained (IAEA/FAO database, <http://www-infocris.iaea.org/MVD>). As a result, 1825 (57%) mutants show better agronomic and botanical characteristics, 577 (18%) show increases in yield, 321 (10%) have improvements in nutritional quality, 200 (6%) in tolerance to biotic stress, and 125 (4%) in abiotic stress (Suprasanna *et al.*, 2015). The mutants have had a great economic impact worldwide and contributed to profits of millions of dollars annually in the economies of the countries involved (Cabrera-Ponce *et al.*, 2019). Research in mutagenesis has shown great progress in recent decades due to advances in genomics. New methods to detect genetic variations and the selection of mutated phenotypes were developed and some examples are: TILLing (“Targeted Induced Local Lesions” or induced local lesions aimed at genome targets), eco-tilling, RNA interference, mismatch mutagenesis (*mismatch*) in site-specific, homologous recombination, reverse and inverse genetics via transposition elements, genetic replacement, gene addition, transcriptome modification by mutagenic treatment, aneuploidy and loss of uniparental chromosome (Cabrera-Ponce *et al.*, 2019).

Insertional mutagenesis

This is caused from the insertion of DNA through genetic transformation or insertion of T-DNA (T-DNA insertion mutagenesis), or by transposon activation (transpositional mutagenesis). The use of biotechnology of transgenic plants has provided significant economic benefits since its inception. For example, the insect resistance trait (IR) has generated high revenues by improving plant yields in all countries where it is applied. Many farmers, especially in developing countries, have benefited from lower production costs by applying this technology, because they have reduced expenses related to the acquisition of insecticides. Since 1996, the accumulated earnings are 41.5 billion dollars in the United States (USA) (Brookes and Barfoot, 2016).

Site-directed mutagenesis (genome editing)

It is the process of creating a mutation in a defined site of the DNA, so the sequence data of the

los rendimientos de las plantas en todos los países donde se aplica. Muchos agricultores, en especial en los países en desarrollo, se han beneficiado de los costos de producción menores al aplicar esta tecnología, porque han reducido los gastos relacionados con la adquisición de insecticidas. Desde 1996, las ganancias acumuladas son 41.5 mil millones de dólares en Estados Unidos (EE. UU.) (Brookes y Barfoot, 2016).

Mutagénesis dirigida al sitio (edición de genomas)

Es el proceso de crear una mutación en un sitio definido del ADN, y se requieren los datos de la secuencia del genoma completo del organismo el cual se modificará. Técnicas de ingeniería genética se usan para efectuar modificaciones de secuencias del ADN en plantas de interés, vía recombinación homóloga mediada por “gene targeting” y por oligonucleótidos. Éstas se consideran como las técnicas de manipulación genética más limpias y directas para el mejoramiento genético de plantas.

Los mutantes generados se caracterizan por el reemplazamiento de un fragmento del ADN original por una molécula diferente, y se puede limitar a un sólo nucleótido (A, G, C o T). Con estas técnicas también es posible generar mutantes mediante bloqueo (*knock-out*) o inserción (*knock-in*). De esta manera, la ingeniería genética dirigida al genoma también se conoce como edición de genomas, y emergió como una alternativa de gran potencial para el fitomejoramiento y la producción de plantas transgénicas.

PLANTAS EDITADAS EN EL GENOMA

Una planta editada es aquella en la cual se produjo una o varias modificaciones puntuales estables en el genoma, a través de técnicas de biología molecular. La modificación es heredable a través de la segregación sexual, en donde la región transgénica debe eliminarse después de la edición de un gen en particular.

¿Con qué propósito se crean?

Esta tecnología es una alternativa para el fitomejoramiento porque es más rápida y precisa, e incrementa

entire genome of the organism that will be modified is required. Genetic engineering techniques are used to make DNA sequence modifications in plants of interest, via homologous recombination mediated by “gene targeting” and by oligonucleotides. These are considered as the cleanest and most direct genetic manipulation techniques for the genetic improvement of plants.

The mutants generated are characterized by the replacement of a fragment of the original DNA with a different molecule and can be limited to a single nucleotide (A, G, C or T). With these techniques it is also possible to generate mutants by blocking (knock-out) or insertion (knock-in). In this way, genome-directed genetic engineering is also known as genome editing and emerged as an alternative of great potential for plant breeding and the production of transgenic plants.

GENOME EDITED PLANTS

An edited plant is one in which one or several stable point modifications occurred in the genome, through molecular biology techniques. The modification is inheritable through sexual segregation, where the transgenic region must be removed after the edition of a particular gene.

For what purpose are they created?

This technology is an alternative for plant breeding because it is faster and more accurate and increases basic knowledge of the genome of model crops and plants. Genome editing allows direct and directed modification of a desired crop characteristic, for example, resistance to abiotic stress. In addition, it provides the ability to directly introduce desired characteristics in the new elite lines (in the case that they can be manipulated), with less negative impact, that is, without losing performance by introgression.

Edited plants are almost identical to the plants obtained by plant breeding and their risk analysis should be evaluated based on the resulting product, rather than the process that created them (Songstad *et al.*, 2017; Cabrera-Ponce *et al.*, 2019; Patel and Mishra, 2019). In this context, the plants derived from the application of these techniques are indistinguishable from the plants obtained by plant breeding or mutagenesis product. Therefore, they

el conocimiento básico del genoma de los cultivos y plantas modelo. La edición del genoma permite la modificación directa y dirigida de una característica deseada del cultivo, por ejemplo, resistencia a estrés abiótico. Además, brinda la capacidad de introducir directamente características deseadas en las nuevas líneas élites (en el caso de poderse manipular), con menos impacto negativo, es decir, sin perder el rendimiento por introgresión.

Las plantas editadas son casi idénticas a las plantas obtenidas por fitomejoramiento y su análisis de riesgo se debe evaluar en función del producto resultante, en lugar del proceso por el cual se creó (Songstad *et al.*, 2017; Cabrera-Ponce *et al.*, 2019; Patel y Mishra, 2019). En este contexto, las plantas derivadas de la aplicación de estas técnicas son indistinguibles de las plantas obtenidas por fitomejoramiento o producto de mutagénesis. Por ello, no se deben regular de la misma manera a los productos generados por otros métodos de ingeniería genética (Sauer *et al.*, 2016; Songstad *et al.*, 2017).

Legislaciones

La regulación de los cultivos transgénicos en EE. UU. por el Departamento de Agricultura (USDA) se fundamenta en la Ley de Protección de las Plantas (PPA) el cual, en términos generales otorga a la USDA la autoridad para regular las plantas plaga o malezas nocivas, incluidos los organismos genéticamente modificados o GM, los cuales son o tienen el potencial de ser plagas de plantas. Sin embargo, el USDA señaló que los cultivos modificados genéticamente que no contienen ADN “foráneo” no se consideran cultivos modificados genéticamente y, por lo tanto, no requieren la regulación del USDA (Waltz, 2016).

Los cultivos editados en el genoma han abierto nuevas estrategias comerciales para la producción de cultivos con una o más modificaciones genéticas. Las tecnologías de edición de genes han permitido que más de 30 tipos de cultivos diseñados por ingeniería genética eviten por completo la regulación del USDA (Waltz, 2016). Uno de estos cultivos es el champiñón blanco editado por CRISPR/Cas9, y otro ejemplo es una edición de maíz ceroso con esta misma tecnología (Waltz, 2016; Zhang *et al.*, 2018).

En la Corte de Justicia de la Comunidad Europea (Broll *et al.*, 2019), se ha dictaminado que los cultivos

should not be regulated in the same way as products generated by other genetic engineering methods (Sauer *et al.*, 2016; Songstad *et al.*, 2017).

Legislations

The regulation of GM crops in the USA by the Department of Agriculture (USDA) is based on the Plant Protection Act (PPA) which, in general terms, gives the USDA the authority to regulate harmful pest or weed plants, including genetically modified organisms or GM, which they are or have the potential to be plant pests. However, the USDA noted that genetically modified crops that do not contain “foreign” DNA are not considered genetically modified crops, and therefore do not require USDA regulation (Waltz, 2016).

Genome edited crops have opened up new commercial strategies for crop production with one or more genetic modifications. Gene editing technologies have allowed more than 30 types of genetically engineered crops to completely avoid USDA regulation (Waltz, 2016). One of these crops is the white mushroom edited by CRISPR/Cas9, and another example is an edition of waxy corn with this same technology (Waltz, 2016; Zhang *et al.*, 2018).

In the Court of Justice of the European Community (Broll *et al.*, 2019), it has been ruled that the cultures obtained by mutagenesis are genetically modified organisms (GMOs) and are subject to the obligations established by the GMO directive. But organisms obtained by mutagenesis techniques, conventionally used in various applications and with a long safety record, are exempt from those obligations. The foregoing, in the understanding that Member States are free to subject them in accordance with European Union (EU) legislation to the obligations provided for in the directive or other obligations (Urnov *et al.*, 2018; Parrott, 2018; Broll *et al.*, 2019).

GENOME EDITING TECHNIQUES

Oligonucleotide-directed mutagenesis (ODM)

This technology takes advantage of the normal cell DNA repair system to correct and change specific bases within the genome. A chemically synthesized oligonucleotide is designed to create

obtenidos por mutagénesis son organismos genéticamente modificados (OGM) y están sujetos a las obligaciones establecidas por la directiva de OGM. Pero, los organismos obtenidos mediante técnicas de mutagénesis, usados convencionalmente en varias aplicaciones y con un largo historial de seguridad, están exentos de esas obligaciones. Lo anterior, en el entendimiento de que los Estados miembros son libres de someterlos de conformidad con la legislación de la Unión Europea (UE) a las obligaciones previstas en la directiva u otras obligaciones (Urnov *et al.*, 2018; Parrott, 2018; Broll *et al.*, 2019).

TÉCNICAS DE EDICIÓN DE GENOMA

Mutagénesis dirigida por oligonucleótidos (ODM)

Esta tecnología aprovecha el sistema normal de reparación del ADN de la célula para corregir y cambiar bases específicas dentro del genoma. Un oligonucleótido sintetizado químicamente está diseñado para crear pares de bases no homólogas, respecto a la secuencia blanco dentro del genoma del organismo huésped. El oligonucleótido se hibrida en la región objetivo y los pares de bases no coincidentes funcionan como molde para dirigir el sistema de reparación de la célula en esos sitios. Como resultado se pueden corregir (reemplazar, insertar o eliminar) las bases designadas. Una vez terminado el proceso de corrección, el oligonucleótido se degrada y el gen modificado o reparado, conserva su patrón normal de expresión y estabilidad dentro del genoma (Songstad *et al.*, 2017).

En las plantas, el oligonucleótido no se integra en el genoma de la planta debido a que las modificaciones de los extremos 5' y 3' impiden la ligadura del ADN, además de la actividad de las nucleasas endógenas y otras enzimas que degradan el oligonucleótido. El método difiere de los enfoques de edición del genoma con nucleasas de ingeniería, en el cual el ODM no utiliza una nucleasa al sitio de acción. Las técnicas optimizadas de desarrollo de rasgos ODM dan lugar a los primeros cultivos editados en su genoma para su comercialización (Songstad *et al.*, 2017).

Edición del genoma con nucleasas de ingeniería

Su base es la ruptura de la doble cadena (DSB) del ADN mediante nucleasas específicas de secuencia (SSN)

non-homologous base pairs, relative to the target sequence within the genome of the host organism. The oligonucleotide is hybridized in the target region and mismatched base pairs function as a template to direct the cell repair system at those sites. As a result, the designated bases can be corrected (replaced, inserted or removed). Once the correction process is completed, the oligonucleotide degrades and the modified or repaired gene retains its normal pattern of expression and stability within the genome (Songstad *et al.*, 2017).

In plants, the oligonucleotide does not integrate into the genome of the plant because the modifications of the 5' and 3' ends prevent DNA ligation, in addition to the activity of endogenous nucleases and other enzymes that degrade the oligonucleotide. The method differs from genome editing approaches with engineering nucleases, in that ODM does not use a nuclease at the site of action. Optimized ODM trait development techniques give rise to the first edited crops in their genome for commercialization (Songstad *et al.*, 2017).

Genome editing with engineering nucleases

Its basis is the disruption of the double strand (DSB) of DNA by sequence specific nucleases (SSN) at specific genomic locations, which will stimulate the cell's DNA repair machinery. To date, four classes of SSN have been used.

Meganucleases. Meganucleases or endonuclease target finders (homing endonucleases) are found in eukaryotes, archaea and bacteria, where they recognize 12 bp long DNA sequences. Several hundred meganucleases have been discovered and divided into four families: LAGLIDADG, Hys-Cys box, GIY-YIG and HNH (Patel and Mishra, 2019). The LAGLIDADG family contains meganucleases with wide use, I-CreI and I-SceI. At the beginning, meganucleases could only cut a simple sequence, and therefore, they were limited to altering the endogenous genes. When it was discovered that few amino acid residues can make direct contact with the nucleotides, their binding specificity was altered, and they could target endogenous genes. In corn they are applied to carry out the LG1 gene (liguleless1). Using the designed endonuclease derived from I-CreI, mutations were obtained in 3% of the regenerated T₀ plants (without genetic segregation), which were

en ubicaciones genómicas específicas, las cuales estimularán a la maquinaria de reparación del ADN de la célula. Hasta la fecha, cuatro clases de SSN se han utilizado.

Meganucleasas. Las meganucleasas o buscadores de objetivos de endonucleasas (endonucleasas homing) se encuentran en eucariotes, archaea y bacterias, donde reconocen secuencias de ADN de 12 pb de longitud. Varios cientos de meganucleasas se han descubierto y se dividen en cuatro familias: LAGLIDADG, caja Hys-Cys, GIY-YIG y HNH (Patel y Mishra, 2019). La familia LAGLIDADG contiene las meganucleasas con amplio uso, I-CreI y I-SceI. Al inicio, las meganucleasas sólo podían cortar una secuencia simple, y por ello, se limitaban a alterar los genes endógenos. Cuando se descubrió que pocos residuos de aminoácidos pueden hacer contacto directo con los nucleótidos, se alteró su especificidad de unión y pudieron dirigirse a genes endógenos. En el maíz se aplican para efectuar la edición del gen *LG1* (liguleless1). Mediante la endonucleasa diseñada derivada de I-CreI, se obtuvieron mutaciones en el 3% de las plantas T_0 regeneradas (sin segregación genética), las cuales fueron mono, bi-alélicas y quiméricas para dicha mutación (Gao *et al.*, 2010).

Nucleasas con dedos de zinc (ZFN). Las ZFN son nucleasas artificiales creadas de la fusión de dominios dedos de zinc de unión al ADN con un dominio nucleasa de la enzima FokI de tipo IIS. Este último dominio se dimeriza para fragmentar el ADN y es necesario un par de ZFN para reconocer sitios del ADN no palindrómicos. Las ZFNs se pueden modificar para reconocer secuencias de ADN específicas y cercanas a la mutación elegida, e introducir en la célula una secuencia normal sin la mutación. La nucleasa corta las dos hebras del ADN y usa la secuencia silvestre como molde para la reparación celular mediante recombinación homóloga.

Las ventajas de usar nucleasas con dedos de zinc es que reparan la secuencia del gen sin integrar ninguna secuencia en el genoma, la eficiencia es muy alta y rápida, las mutaciones son permanentes, tanto ediciones simples como bi-alélicas ocurren en una alta frecuencia, y no se requiere marcador de selección (Patel y Mishra, 2019; Carroll, 2011). Las ZFNs se han usado para modificar genes endógenos de diversas especies de plantas, como *Arabidopsis*, tabaco, soya

mono, bi-alélicas y chimeric for said mutation (Gao *et al.*, 2010).

Nucleasas with zinc fingers (ZFN). ZFNs are artificial nucleases created from the fusion of DNA binding zinc finger domains with a nuclease domain of the IIS-type FokI enzyme. This last domain has to be dimerized to fragment the DNA and a pair of ZFNs is necessary to recognize non-palindromic DNA sites. The ZFNs can be modified to recognize specific DNA sequences and close to the chosen mutation, and introduce a normal sequence into the cell without the mutation. The nuclease cuts the two strands of DNA and uses the wild sequence as a template for cell repair by homologous recombination.

The advantages of using zinc finger nucleases are that they repair the gene sequence without integrating any sequence into the genome, the efficiency is very high and fast, the mutations are permanent, both simple and bi-allelic editions occur at a high frequency, and no selection marker is required (Patel and Mishra, 2019; Carroll, 2011). ZFNs have been used to modify endogenous genes of various plant species, such as *Arabidopsis*, tobacco, soybean and corn (Patel and Mishra, 2019). One of the main problems for the application of this technology is the limited number of specific sites in the DNA, the dependence on the effects of repeated binding and the low efficiency of the defined site (DeFrancesco, 2011).

Transcription activating type effector nucleases (TALENs). TALENs are virulence factors secreted by *Xanthomonas* that cause diseases in rice and cotton (Patel and Mishra, 2019; Bogdanove *et al.*, 2010). These factors are injected into the host cell through the type III secretion system and interfere with cellular activities by activating the transcription of specific genes (Bogdanove *et al.*, 2010). The application of TALENs to edit DNA was due to the discovery of DNA binding mechanisms in 2009 (Patel and Mishra, 2019). As genome editing technology, TALENs are nucleases that can be designed to cut specific sequences in DNA, to bind to any DNA sequence, and when combined with the cutting domain of a nuclease such as FokI, DNA can be cut in a specific place. DNA recognition occurs via two hypervariable amino acid residues at positions

y maíz (Patel y Mishra, 2019). Uno de los principales problemas para la aplicación de esta tecnología es el número limitado de sitios específicos en el ADN, la dependencia de los efectos de los repetidos unidos y la eficiencia baja del sitio definido (DeFrancesco, 2011).

Nucleasas efectoras tipo activadores de la transcripción (TALENs). Los TALENs son factores de virulencia secretados por *Xanthomonas* que causan enfermedades en arroz y algodón (Patel y Mishra, 2019; Bogdanove *et al.*, 2010). Estos factores se inyectan en la célula huésped a través del sistema de secreción tipo III e interfieren con las actividades celulares mediante la activación de la transcripción de genes específicos (Bogdanove *et al.*, 2010). La aplicación de los TALENs para editar el ADN se debió a que en 2009 se descubrieron los mecanismos de unión al ADN (Patel y Mishra, 2019). Como tecnología de edición de genomas, los TALEN son nucleasas que se pueden diseñar para cortar secuencias específicas en el ADN, para unirse a cualquier secuencia de ADN, y al combinarse con el dominio de corte de una nucleasa como FokI, el ADN se puede cortar en un sitio específico. El reconocimiento del ADN ocurre vía dos residuos de aminoácidos hipervariables en las posiciones 12 y 13 entre cada repetición, denominado “repetido-variable-di residuo” (RVDs) para crear un TAL. La unión de los repetidos es sencilla y se pueden ensamblar modularmente, variando los RVDs para crear una proteína efector TAL que reconozca un sitio específico del ADN. La tecnología de edición TALEN tiene amplio uso en células pluripotentes humanas (Hockemeyer *et al.*, 2011), en plantas (Mahfouz *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013; Patel y Mishra, 2019) y otros organismos.

Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interpuestas (CRISPR/Cas9)

El sistema CRISPR/Cas9 actúa como un tipo de inmunidad adaptativa en procariontes el cual se formó a lo largo de la historia evolutiva, puede degradar genes exógenos de un fago o plásmido invasor y se observó por primera vez en 1987. Patel y Mishra (2019) encontraron un intervalo de aproximadamente 32 nt (nucleótidos) de secuencias no repetitivas y “repeticiones en tándem” corriente abajo del gen *iap* en *Escherichia coli*. En 2002, las “repeticiones en tándem”

12 and 13 between each repetition, called “repeated-variable-di residue” (RVDs) to create a TAL. Repeat binding is simple and can be assembled modularly, varying RVDs to create a TAL effector protein, which recognizes a specific DNA site. TALEN editing technology is widely used in human pluripotent cells (Hockemeyer *et al.*, 2011), in plants (Mahfouz *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013; Patel and Mishra, 2019) and other organisms.

Short palindromic repeats grouped and regularly interposed (CRISPR/Cas9)

The CRISPR/Cas9 system acts as a type of adaptive immunity in prokaryotes that formed throughout evolutionary history, can degrade exogenous genes from an invading phage or plasmid and was first observed in 1987. Patel and Mishra (2019) found a range of approximately 32 nt (nucleotides) of non-repetitive sequences and “tandem repeats” downstream of the *iap* gene in *Escherichia coli*. In 2002, “tandem repetitions” were called “short palindromic repeats grouped regularly interposed”, and hence the acronym CRISPR (Patel and Mishra, 2019).

In 2005 it was found that the CRISPR spacer sequence was highly homologous with the exogenous sequences of bacterial plasmids and phage. Because of this, CRISPR can recognize foreign genetic material. In 2013, CRISPR/Cas9, the gene editing tool for specific sites (Cho *et al.*, 2013; Patel and Mishra, 2019) was developed. CRISPR/Cas9 only requires a brief guide RNA sequence to recognize target loci according to Watson-Crick base pairing; Cas9 endonuclease activity can lead to gene modification by producing double strands in the target DNA, which stimulate DNA repair mechanisms *in vivo*, resulting in mutation of the gene (by insertion, deletion and replacement).

PRACTICAL APPLICATIONS OF GENOME EDITED PLANTS

Herbicide resistance

ODM technology was applied in corn to induce mutations in the enzyme acetohydroxy acid synthase (AHAS), also known as acetolactate synthase (ALS), which confers resistance to the herbicides

se denominaron “repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interpuestas”, y de ahí las siglas CRISPR (Patel y Mishra, 2019).

En 2005 se encontró que la secuencia espaciadora CRISPR era altamente homóloga con las secuencias exógenas de plásmidos bacterianos y fagos. Debido a esto, CRISPR puede reconocer material genético extraño. En 2013 se desarrolló CRISPR/Cas9, la herramienta de edición de genes para sitios específicos (Cho *et al.*, 2013; Patel y Mishra, 2019). CRISPR/Cas9 sólo requiere una breve secuencia de ARN guía para reconocer los loci objetivo de acuerdo con el emparejamiento de bases de Watson-Crick; la actividad de endonucleasa de Cas9 puede conducir a la modificación del gen al producir cortes de cadena doble en el ADN objetivo, que estimulan los mecanismos de reparación del ADN *in vivo* y dan como resultado la mutación del gen (por inserción, eliminación y reemplazo).

APLICACIONES PRÁCTICAS DE LAS PLANTAS EDITADAS EN EL GENOMA

Resistencia a herbicidas

La tecnología ODM se aplicó en el maíz para inducir mutaciones en la enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS), también conocida como acetolactato sintasa (ALS), la cual confiere resistencia a los herbicidas imidazolinona y sulfonilurea (Cabrera-Ponce *et al.*, 2019). La eficiencia de mutación estimada fue 1×10^1 a 1.4×10^4 , y mejor en aproximadamente 3 órdenes de magnitud a la tasa de mutación espontánea (1×10^7 o inferior). Además, Cabrera-Ponce *et al.* (2019) describieron la producción de plantas de maíz tolerantes al herbicida imidazolinona, mediante una mutación puntual dirigida a la substitución de Ser por Asn en la posición 621 (AGT a AAT).

Por medio de la técnica de ZFN se indujeron mutaciones puntuales en dos alelos del gen *ALS* (*SuRA* y *SuRB*) para conferir resistencia a los herbicidas imidazolinona y sulfonilurea en tabaco (Patel y Mishra, 2019). Mediante CRISPR/Cas9, Svitashv *et al.* (2015, 2016) reportaron la edición de genes en maíz del gen *ALS* para conferirle resistencia al herbicida clorosulfurón. La edición de genes se logró mutando el gen *ALS2*, mediante el bombardeo de embriones inmaduros con partículas de oro con una plantilla de reparación de oligo de ADN de cadena única de 127

imidazolinone and sulfonilurea (Cabrera-Ponce *et al.*, 2019). The estimated mutation efficiency was 1×10^1 to 1.4×10^4 , and better at approximately 3 orders of magnitude at the spontaneous mutation rate (1×10^7 or less). In addition, Cabrera-Ponce *et al.* (2019) described the production of corn plants tolerant to the herbicide imidazolinone, through a point mutation directed to the substitution of Ser by Asn at position 621 (AGT to AAT).

Through the ZFN technique, point mutations were induced in two alleles of the *ALS* gene (*SuRA* and *SuRB*) to confer resistance to the herbicides imidazolinone and sulfonilurea in tobacco (Patel and Mishra, 2019). Through CRISPR/Cas9, Svitashv *et al.* (2015, 2016) reported the editing of genes in corn of the *ALS* gene to confer resistance to the chlorosulfuron herbicide. Gene editing was achieved by mutating the *ALS2* gene, by mean of bombarding immature embryos with gold particles that carried a single-stranded DNA oligo repair template of 127 nucleotides. Thus bialaphos/chlorosulfuron herbicide resistant callous were obtained, homozygous plants regenerated for the mutation sought (selecting only in chlorosulfuron), they self-pollinated and the segregating seeds were sprinkled with the herbicide. Plants containing the edited *ALS* alleles showed resistance to the selection factor (Cabrera-Ponce *et al.*, 2019; Patel and Mishra, 2019).

Gene blocking: waxy corn

Gene blocking, gene inactivation or deactivation, consists in suppressing the expression of a specific gene in an organism, replacing the original gene in its locus. The waxy gene (*wx1*) encodes a starch synthase, required for the synthesis of amylose in the endosperm. Traditional corn contains 75% amylopectin and 25% amylose. The variety of waxy corn obtained by plant breeding contains 100% amylopectin (Zhang *et al.*, 2018).

Due to the low yields of this variety, it was decided to edit by CRISPR/Cas9, the *wx1* gene in pure elite corn lines to allow wax production in larger quantities. Chilcoat *et al.*, (2017) edited through CRISPR/Cas9 the cleavage of the *wx1* gene, using a Cas9-siRNA pointing to a sequence upstream of the transcription start site and another Cas9-siRNA directed the cut to a site downstream of the termination codon. The region between the two targets was cleaved and the

nucleótidos. Así se obtuvieron callos resistentes al herbicida bialafos/clorosulfuron, regeneraron plantas homocigotas para la mutación buscada (seleccionando sólo en clorosulfuron), se autopolinizaron y las semillas segregantes se asperjaron con el herbicida. Las plantas con los alelos de *ALS* editados mostraron resistencia al factor de selección (Cabrera-Ponce *et al.*, 2019; Patel y Mishra, 2019).

Bloqueo de genes: Maíz ceroso (waxy corn)

El bloqueo de genes, inactivación o desactivación génica, consiste en suprimir la expresión de un gen específico en un organismo, sustituyendo el gen original en su locus. El gene waxy (*wx1*) codifica para una sintasa de almidón, requerida para la síntesis de amilosa en el endospermo. El maíz tradicional contiene 75% de amilopectina y 25% de amilosa. La variedad de maíz ceroso obtenida por fitomejoramiento contiene 100% de amilopectina (Zhang *et al.*, 2018).

Debido a los bajos rendimientos de esta variedad, se decidió editar mediante CRISPR/Cas9, el gen *wx1* en líneas puras élite de maíz para permitir la producción de cera en mayores cantidades. Chilcoat *et al.* (2017) editaron mediante CRISPR/Cas9 la escisión del gen *wx1*, usando una Cas9-ARNg apuntando a una secuencia corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción y otro Cas9-ARNg dirigió el corte a un sitio corriente abajo del codón de terminación. La región entre los dos blancos se escindió y los extremos cromosómicos distales restantes se unieron a través de la vía NHEJ para reparar el daño en el ADN, y por ende resultó en un alelo *Wx1* nulo con el fenotipo ceroso (waxy).

La modificación del genoma se logró mediante el bombardeo de partículas de embriones inmaduros con partículas de oro con seis plásmidos diferentes los cuales codifican para los dos ARNg, el gen *Cas9* de *S. pyogenes*, los genes de la pluripotencialidad (*WUSCHEL* y *ODP2*) del maíz, y el marcador de selección *NPTII* para la resistencia a la kanamicina y G418. En total, las eliminaciones de *Wx1* se generaron en más de 10 diferentes líneas puras élite de maíz, lo cual permite la producción directa de híbridos derivados de CRISPR/Cas9 con producción de cera (Chilcoat *et al.*, 2017). Los mutantes de semilla de maíz cerosos creados por este proceso tienen un aspecto similar a la cera de la vela debido a un mayor contenido de amilopectina, la cual confiere mayor uniformidad y mejor textura al almidón para su

remaining distal chromosomal ends joined through the NHEJ pathway to repair DNA damage, resulting in a null *Wx1* allele with the waxy phenotype (waxy).

Genome modification was achieved by bombarding immature embryo particles with gold particles carrying six different plasmids encoding the two mRNAs, the Cas9 gene of *S. pyogenes*, the pluripotentiality genes (*WUSCHEL* and *ODP2*) of corn, and the *NPTII* selection marker for kanamycin resistance and G418. In total, *Wx1* eliminations were generated in more than 10 different elite inbred pure corn lines, which allows the direct production of CRISPR/Cas9 derived hybrids that produce wax (Chilcoat *et al.*, 2017). The waxy corn seed mutants created by this process have an appearance similar to candle wax due to a higher amylopectin content, which confers greater uniformity and better texture to the starch for use as an ingredient in various food products, as well as it allows important applications in the textile, adhesive and paper industries.

Drought tolerance: promoter exchange

Drought tolerance is an important attribute desired in commercial corn. The ARGOS8 gene negatively regulates the ethylene response, which is why it is very important in drought tolerance. Naturally, the expression of the ARGOS8 gene is low and absent in non-reproductive tissues. When the ARGOS8 gene is overexpressed, the ethylene response is negatively regulated and improves drought tolerance. Shi *et al.* (2017) performed genome editing using CRISPR/Cas9 to alter the expression of the endogenous corn ARGOS8 gene, through a substitution of promoters. The native promoter was replaced with the corn GOS2 promoter, which normally promotes moderate constitutive expression of the SU1 transcription factor.

Promoters exchange was achieved by bombarding gold microparticles with a DNA repair template, consisting of the GOS2 promoter flanked by two DNA fragments of approximately 400 bp. These coincide with the genomic sequences immediately adjacent to the Cas9 cleavage sites in the ARGOS8 locus. In addition, five carrier plasmids were included: each of the two gRNAs, a gene that encodes the Cas9 of *Streptococcus pyogenes*, the corn pluripotentiality genes (*WUSCHEL* and *ODP2*), and a gene that encodes the selectable marker of phosphomannose isomerase (PMI).

uso como ingrediente de diversos productos alimenticios, así como permite importantes aplicaciones en las industrias textil, de adhesivos y de fabricación de papel.

Tolerancia a la sequía: Intercambio de promotores

La tolerancia a la sequía es un atributo importante que se desea en los maíces comerciales. El gen *ARGOS8* regula negativamente la respuesta del etileno, por lo cual es muy importante en la tolerancia a la sequía. De forma natural, la expresión del gen *ARGOS8* es baja y ausente en tejidos no reproductores. Cuando el gen *ARGOS8* se sobreexpresa, la respuesta del etileno se regula negativamente y mejora la tolerancia a la sequía. Shi *et al.* (2017) efectuaron la edición de genoma mediante CRISPR/Cas9 para alterar la expresión del gen *ARGOS8* endógeno de maíz, mediante una sustitución de promotores. El promotor nativo se reemplazó con el promotor GOS2 del maíz, el cual normalmente promueve la expresión constitutiva moderada del factor de transcripción SU1.

El intercambio de promotores se logró mediante el bombardeo de micropartículas de oro con un molde de reparación de ADN, que consiste en el promotor GOS2 flanqueado por dos fragmentos de ADN de aproximadamente 400 pb. Estos coinciden con las secuencias genómicas inmediatamente adyacentes a los sitios de escisión de Cas9 en el locus *ARGOS8*. Además, se incluyeron cinco plásmidos portadores: cada uno de los dos gRNAs, un gen codificador de la Cas9 de *Streptococcus pyogenes*, los genes de pluripotencialidad del maíz (*WUSCHEL* y *ODP2*), y el gen de la fosfomanosa isomerasa (PMI) como marcador de selección.

La tolerancia a la sequía se logró al colocar las líneas modificadas en medio de regeneración con la inclusión de manosa-6-fosfato, el cual es tóxico para el maíz. Con la expresión de la PMI se convierte la manosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato, la cual no es tóxica. El resultado fue que 172 plántulas crecieron en el agente selectivo, de las cuales 23 fueron positivas para al menos una unión, tres fueron positivas para ambas uniones, y dos produjeron plantas fértiles.

Una de estas plantas estaba libre de ADN foráneo, es decir, no contenía los genes usados en la transformación. La planta editada en *ARGOS8* se evaluó en

Drought tolerance was achieved by placing the modified lines in regeneration medium containing mannose-6-phosphate, which is toxic to corn. With the expression of the PMI, mannose-6-phosphate is converted to fructose-6-phosphate, which is not toxic. The result was that 172 seedlings grew in the selective agent, of which 23 were positive for at least one union, three were positive for both unions, and two produced fertile plants.

One of these plants was free of foreign DNA, that is, it did not contain the genes used in the transformation. The plant edited in *ARGOS8* was evaluated in the field by crossing it with an innate tester and this hybrid was compared with a similar wild-type hybrid in environments with drought stress and with sufficient irrigation. As expected from the previous agronomic characterization of the *GOS2-ARGOS8* transgenic plants, the edited hybrids behaved similarly to those of the wild type under non-limiting irrigation conditions but had a higher yield when grown under drought stress.

Gene insertion: complex trait loci

Most GM corn grown in the USA contains resistance of two or more herbicides and multiple *cry* genes of *Bacillus thuringiensis*, which provide resistance to various insect pests. It is common for a commercial product of this type to contain five different transgenic characters (Chilcoat *et al.*, 2017). These traits were generated by random transformation and are found throughout the genome. When a new variety is developed through traditional plant breeding, transgenic characters are usually stacked in the genome and they must be added through introgression processes, so that the product contains the genome of the elite line plus transgenes of interest.

Due to the various limitations present in this technology, it is convenient to obtain plants with complex trait loci (CTL). In these, the transgenes are separated by 50 kb or more, decrease the chances of interaction between them, and allow them to be eliminated individually (or added new genes) within the context of a simple locus. To create a corn CTL, genome editing by CRISPR/Cas9 can be used, so that transgenes can be directed in selected genomic regions by homologous recombination. Chilcoat *et al.* (2017) improved the efficiency of this process

campo cruzándola con un probador innato y este híbrido se comparó con un híbrido similar de tipo silvestre en ambientes con estrés por sequía y con suficiente riego. Como se esperaba de la caracterización agronómica previa de las plantas transgénicas *GOS2-ARGOS8*, los híbridos editados se comportaron de manera similar a los de tipo silvestre en condiciones no limitantes de riego, pero tuvieron un mayor rendimiento cuando se cultivaron bajo estrés por sequía.

Inserción de genes: Locus de rasgos complejos

La mayoría de los maíces transgénicos cultivados en EE. UU. incluyen resistencia a dos o más herbicidas y múltiples genes *cry* de *Bacillus thuringiensis*, y estos proporcionan resistencia a varias plagas de insectos. Es común que un producto comercial de este tipo contenga cinco caracteres transgénicos diferentes (Chilcoat *et al.*, 2017). Estos rasgos se generaron mediante transformación aleatoria y se encuentran en todo el genoma. Cuando una nueva variedad se desarrolla a través del fitomejoramiento tradicional, los caracteres transgénicos usualmente se encuentran apilados en el genoma y se deben adicionar a través de procesos de introgresión, de forma tal que el producto contenga el genoma de la línea élite más los transgenes de interés.

Debido a las diversas limitaciones presentes en esta tecnología, es conveniente la obtención de plantas con loci de rasgos complejos (CTL). En éstas, los transgenes están separados por 50 kb o más, disminuyen las posibilidades de interacción entre ellos, y permiten que se puedan eliminar de forma individual (o adicionados nuevos genes) dentro del contexto de un locus simple. Para crear una CTL de maíz se puede usar la edición del genoma por CRISPR/Cas9, de forma tal que se puedan dirigir transgenes en regiones genómicas seleccionadas mediante recombinación homóloga. Chilcoat *et al.* (2017) mejoraron la eficiencia de este proceso en maíz al insertar a través de CRISPR/Cas9 y en locaciones determinadas del genoma, sitios de integración específica del tipo SSI, este último basado en el sistema de recombinasa FLP/FRT. Las ubicaciones objetivo se seleccionaron para estar cerca una de la otra, pero lo suficientemente distantes (0,1 centimorgan) para ser genéticamente separables, y se seleccionaron para estar alejadas de los genes endógenos.

in corn by inserting through CRISPR/Cas9 and in specific genome locations, specific integration sites of the SSI type, the latter based on the FLP/FRT recombinase system. Target locations were selected to be close to each other, but distant enough (0.1 centimorgan) to be genetically separable and selected to be away from endogenous genes.

Several dozen white SSI lines were generated using particle bombardment with plasmids with an rRNA, Cas9 gene of *S. pyogenes*, the pluripotentiality genes (WUSCHEL and ODP2) of corn and a DNA template of double stranded, with approximately 400 base pairs of sequences corresponding to the genomic regions on each side of the cutting site, with the NPTII selection marker and with FRT border sequences in the middle. The events were regenerated in media containing G418, and as a result several dozen lines were generated that had exactly the desired DNA sequence, as assessed by the southern sequencing technique (SbS) with an average efficiency of approximately 0.1%, that is, a perfect event for 1000 embryos bombed. A subset of these lines was characterized considering the genetic location and level of expression of the transgene, the ability to transform and the agronomic (Chilcoat *et al.*, 2017).

In transgenic cotton D'Halluin and Ruitter (2013) demonstrated for the first time through the use of meganucleases in specific DNA sites, the ability to precisely stack and integrate into an elite locus, transgenes of a transgenic cotton line. Approximately 2% of the separately modulated callus lines had precise insertion, in addition to the ability to pass the stacked characteristics to the progeny.

Resistance to *Xanthomonas oryzae pv. Oryzae* in rice

Several genome editing techniques, such as the CRISPR/Cas9 and TALEN systems, are frequently used to achieve resistance to diseases in crops such as rice. Disease-resistant rice varieties can be achieved through the potential application of TALEN technology. Interactions between the TAL effectors of the susceptibility genes for host infection (S) and *Xanthomonas oryzae pv. Oryzae*, cause the disease of the bacterial blight of rice. The pathogen translocates and develops its virulence proteins.

Varias docenas de líneas blanco de SSI se generaron usando el bombardeo de partículas con plásmidos con un ARNg, el gen *Cas9* de *S. pyogenes*, los genes de pluripotencialidad (*WUSCHEL* y *ODP2*) del maíz y una plantilla de ADN de doble cadena, con aproximadamente 400 pares de bases de secuencia correspondientes a las regiones genómicas en cada lado del sitio de corte, con el marcador de selección *NPTII* con secuencias bordes de la FRT en el medio. Los eventos se regeneraron en medios que contenían G418, y como resultado se generaron varias docenas de líneas con la secuencia del ADN deseada, según lo evaluado por la técnica de secuenciación por southern (SbS) con una eficiencia promedio de aproximadamente 0.1%, es decir, un evento perfecto por 1000 embriones bombardeados. Un subconjunto de estas líneas se caracterizó considerando la ubicación genética y el nivel de expresión del transgén, la capacidad de transformación y la agronomía (Chilcoat *et al.*, 2017).

En algodón transgénico D'Halluin y Ruitter (2013) demostraron por primera vez a través del uso de meganucleasas en sitios específicos del ADN, la capacidad de apilar e integrar en forma precisa en un locus élite, transgenes de una línea de algodón transgénica. Aproximadamente, el 2% de las líneas de callos moduladas por separado tenían una inserción precisa, además de la capacidad de pasar las características apiladas a la progenie.

Resistencia a *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* en el arroz

Varias técnicas de edición del genoma, como los sistemas CRISPR/Cas9 y TALEN se usan con frecuencia para lograr resistencia a enfermedades en cultivos como el arroz. Las variedades de arroz resistentes a las enfermedades se pueden lograr a través de la aplicación potencial de la tecnología TALEN. Las interacciones entre los efectores TAL de los genes de susceptibilidad a la infección del huésped (S) y *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*, causan la enfermedad del añublo bacteriano del arroz. El patógeno se transloca y desarrolla sus proteínas de virulencia.

Una vez que los efectores de TAL se introducen en la célula huésped, se unen a los elementos promotores de los genes del huésped (S) a través de los elementos de unión al efector (EBE), lo cual resulta en la activación de la expresión del gen S, y al final

Once the TAL effectors are introduced into the host cell, they are linked to the promoter elements of the host (S) genes through the effector binding elements (EBE), which results in the activation of the expression of the S gene, and at the end develops a strong susceptible reaction between the bacterial pathogen and the host plant. Small changes in the TAL effector binding sequences in the S genes produce plants that are resistant to bacterial pathogens. Due to these changes, the TAL effectors could not identify the white site in the S gene.

Blanvillain-Baufumé *et al.* (2017) edited the Japanese rice *Oryza sativa* L. *ssp. japonica* (vars. Kitaake and Nipponbare) using the TALEs AvrXa7, PthXo3, TalC and Tal5. These are responsible for targeting the rice SWEET14 gene and making it susceptible to invasion by *X. oryzae* pv. *Oryzae* (*Xoo*). The mutations obtained in AvrXa7 and Tal5 produced resistant rice plants, while with TalC they were susceptible.

Aroma in rice

Aromatic rice produces a primary fragrance compound, 2-acetyl-1-pyrroline (2AP), which is synthesized when a non-functional betaine aldehyde dehydrogenase (*BADH2*) is present. In the presence of *BADH2*, 2AP synthesis is inhibited by diverting gamma aminobutyraldehyde towards the synthesis of gamma aminobutyric acid (GABA). By interrupting *BADH2*, the amino butyraldehyde range is converted to acetylpyroline, which is responsible for the introduction of the fragrance into rice. Shan *et al.* (2015) edited the *BADH2* gene using TALEN technology and found that the content of 2AP in the rice grain increased from 0.35 to 0.75 mg kg⁻¹, due to the interruption of *BADH2*. The increase in 2AP content was almost equal to that present in the aromatic rice variety that was used as a positive control.

Resistant wheat to dusty mildew

Blumeria graminis f.sp. *tritici* (mandatory biotrophic fungus) causes dusty mildew, one of the serious diseases of wheat crops as it drastically reduces yield, in temperate areas. TALEN and CRISPR/Cas9 technologies were used to edit *Triticum aestivum* L. hexaploid wheat in three homoalleles (MLO), which

desarrolla una fuerte reacción susceptible entre el patógeno bacteriano y la planta huésped. Los pequeños cambios en las secuencias de unión al efector TAL en los genes S producen plantas resistentes a los patógenos bacterianos. Debido a estos cambios, los efectores TAL ya no podrían identificar el sitio blanco en el gen S.

Blanvillain-Baufumé *et al.* (2017) editaron el arroz japonés *Oryza sativa* L. ssp. *japonica* (vars. Kitaake y Nipponbare) mediante los TALEs AvrXa7, PthXo3, TalC y Tal5. Estos son responsables de dirigirse al gen *SWEET14* de arroz y volverlo susceptible a la invasión por *X. oryzae pv. oryzae* (Xoo). Las mutaciones obtenidas en AvrXa7 y Tal5 produjeron plantas de arroz resistentes, mientras con TalC fueron susceptibles.

Aroma en el arroz

El arroz aromático produce un compuesto de fragancia primario, el 2-acetil-1-pirrolina (2AP), el cual se sintetiza cuando está presente una betaína aldehído deshidrogenasa (*BADH2*) no funcional. En presencia de *BADH2*, la síntesis de 2AP se inhibe al desviarse la gama aminobutiraldehído hacia la síntesis del ácido gamma amino butírico (GABA). Al interrumpir *BADH2*, el gamma amino butiraldehído se convierte en acetilpirrolina, el cual es responsable de la introducción de la fragancia en el arroz. Shan *et al.* (2015) editaron el gen *BADH2* usando la tecnología TALEN y encontraron que el contenido de 2AP en el grano de arroz aumentó de 0.35 a 0.75 mg kg⁻¹, debido a la interrupción de *BADH2*. El aumento en el contenido de 2AP fue casi igual al presente en la variedad de arroz aromático utilizada como control positivo.

Trigo resistente al mildiu polvoriento

Blumeria graminis f.sp.tritici (hongo biotrófico obligatorio) causa el mildiu polvoriento, una de las enfermedades graves de los cultivos que reduce drásticamente el rendimiento en las zonas templadas. Las tecnologías TALEN y CRISPR/Cas9 se usaron para editar el trigo hexaploide *Triticum aestivum* L en tres homoealelos (MLO), y estos confieren resistencia al mildiu polvoriento del trigo, *Blumeria graminis f.sp. tritici*. Mediante TALEN se indujeron mutaciones en tres alelos *TaMLO* (*A1*, *B1* y *D1*), y generaron plantas resistentes al mildiu polvoriento. Mediante el

conferir resistencia to the dusty mildew of the wheat, *Blumeria graminis f.sp.tritici*. Through TALEN mutations were induced in three *TaMLO* alleles (*A1*, *B1* and *D1*), and generated plants resistant to dusty mildew. Through CRISPR/Cas9 they generated mutants in the *TaMLO-A1* allele. The authors do not describe the degree of resistance found in this type of mutation (Patel and Mishra, 2019).

Decreased phytic acid in corn

In corn grain, 55% of the phosphorus is stored as phytic acid that human beings do not digest easily. Phytic acid is an anti-nutritive compound that has a negative impact on nutrient absorption and also affects the environment as it enters the waste stream. Through genome engineering technologies, a significant reduction in phytic acid concentration was achieved. An insertion disruption of the *IPK1* gene was performed, which codes for 1,3,4,5,6-penta cis phosphate 2-kinase, which is essential for the biosynthesis of phytic acid. The above was done using ZFN technology designed to cut in exon 2 of the *IPK1* gene, as well as perform the insertional addition of the *PAT* gene, which confers herbicide tolerance. Herbicide tolerant plants were obtained without the expression of the *IPK1* gene and, therefore, not producing phytic acid (Cabrera-Ponce *et al.*, 2019).

Oleic acid level in soybean oil

Haun *et al.* (2014) used TALEN technology to inactivate the fatty acid desaturase genes in soybeans, *FAD2* and *FAD3*, responsible for the conversion of oleic acid (monosaturated) to linolenic acid (polyunsaturated). As a result, DNA sequences conserved in both genes were interrupted, thereby compromising the enzymatic activity or its regulation. The resulting soybean varieties contained a high amount of oleic acid (wild 20% vs. 80% edited) and a lower proportion of polyunsaturated fatty acids, including linoleic acid (50% wild vs. 4% edited).

Fatty acid content

Gupta *et al.* (2012) demonstrated in canola, that through ZFP technology, transcriptional activation of b-ketoacyl-ACP synthase II can be performed, increase C18 fatty acids and decrease palmitic acid.

uso de CRISPR/Cas9 generaron mutantes en el alelo *TaMLO-A1*. Los autores no describen el grado de resistencia encontrado en este tipo de mutación (Patel y Mishra, 2019).

Disminución del ácido fítico en el maíz

En el grano de maíz, 55% del fósforo se almacena como ácido fítico, que no es digerido fácilmente por el ser humano. El ácido fítico es un compuesto anti-nutritivo con un impacto negativo en la absorción de nutrientes y también afecta el medio ambiente al entrar en la corriente de desechos. Mediante tecnologías de ingeniería del genoma, se logró una reducción significativa en la concentración de ácido fítico. Se efectuó una disrupción insercional del gen *IPK1*, que codifica para la 1,3,4,5,6-penta cis fosfato 2-cinasa, que es esencial para la biosíntesis del ácido fítico. Lo anterior se realizó mediante la tecnología de ZFN diseñada para cortar en el exón 2 del gen *IPK1*, así como realizar la adición insercional del gen *PAT* que confiere tolerancia a herbicida. Plantas tolerantes al herbicida se obtuvieron sin la expresión del gen *IPK1* y, por lo tanto, no productoras de ácido fítico (Cabrera-Ponce *et al.*, 2019).

Nivel de ácido oleico en aceite de soya

Haun *et al.* (2014) utilizaron la tecnología de TALEN para inactivar los genes de la desaturasa de ácidos grasos en la soya, *FAD2* y *FAD3*, responsables de la conversión del ácido oleico (monosaturado) en ácido linolénico (poliinsaturado). Como resultado se interrumpieron secuencias de DNA conservadas en ambos genes, con lo cual comprometieron la actividad enzimática o su regulación. Las variedades de soya resultantes contenían una cantidad alta de ácido oleico (silvestre 20% *vs.* 80% editado) y una menor proporción de ácidos grasos polisaturados, incluido el ácido linoleico (50% en silvestre *vs.* 4% en las editadas).

Contenido de ácidos grasos

Gupta *et al.* (2012) demostraron en la canola que a través de la tecnología de ZFP se puede realizar la activación transcripcional de b-cetoacil-ACP sintasa II, aumentar los ácidos grasos C18 y disminuir el ácido palmítico.

TECHNOLOGICAL PROBLEMS IN PLANT GENOME EDITION

Non-transgenic plants production

Although it has been shown that through the use of ODM, meganuclease, ZFN and TALEN editing technologies that crops can be edited accurately, CRISPR/Cas9 technology has had the widest use in plants to introduce genome modifications and paves the way for the precision improvement of the characters in crops. CRISPR/Cas9 constructs are introduced into plant cells by transferring the T-DNA from the *Agrobacterium tumefaciens* (*Rhizobium radiobacter*) system or by biobalistics, which is expressed, adheres to the defined site and produces mutations. During this process there is a high probability that the CRISPR/Cas9 constructs are integrated into the genome of the plant (Zhang *et al.*, 2016). This increases the chances of producing unwanted changes, of which the most important are the integration of transgenes and mutations out of range. In addition, once inside the recipient cell, CRISPR/Cas9 can be degraded and the resulting fragments can serve as DNA filler in the double chain cut repair process and inserted into desired or unwanted sites (Songstad *et al.*, 2017; Cabrera-Ponce *et al.*, 2019; Patel and Mishra, 2019).

Small insertions and deletions (indels) or substitutions at chromosome sites that are not naturally distinguishable are induced through the engineering nuclease system. Legislative aspects of edited plants are an important public concern (Songstad *et al.*, 2017). In crops that reproduce sexually, transgenes (Cas9 and RNAg) and other genes such as those of pluripotentiality (ODP2 and WUSCHEL) of corn, can be removed from the genome of the plant after seed formation (Cabrera-Ponce *et al.*, 2019; Patel and Mishra, 2019). However, this strategy is not useful for plants that propagate vegetatively, and in most cases it takes many years to reach sexual maturity (Artlip *et al.*, 2016).

Use of CRISPR/Cas9 RNA (TECCRNA) as an alternative

Zhang *et al.* (2016) demonstrated the production of transgene free (non-transgenic) mutants in the T₀ generation. This was done for several wheat genes

PROBLEMAS TECNOLÓGICOS EN LA EDICIÓN DEL GENOMA DE PLANTAS

Producción de plantas no transgénicas

Aunque se ha demostrado mediante el uso de las tecnologías de edición ODM, meganucleasa, ZFN y TALEN que se pueden editar cultivos en forma precisa, la tecnología de CRISPR/Cas9 ha tenido el uso más amplio en plantas para introducir modificaciones en el genoma, y abre el camino para el mejoramiento de precisión de los caracteres en cultivos. Las construcciones del CRISPR/Cas9 se introducen en las células vegetales mediante la transferencia del T-ADN del sistema de *Agrobacterium tumefaciens* (*Rhizobium radiobacter*) o mediante biobalística, el cual se expresa, se adhiere al sitio definido y produce mutaciones. Durante este proceso hay una probabilidad alta de que las construcciones del CRISPR/Cas9 se integren en el genoma de la planta (Zhang *et al.*, 2016). Esto incrementa las posibilidades de producir cambios no deseados, de los cuales los más importantes son la integración de los transgenes y mutaciones fuera de rango. Además, una vez dentro de la célula receptora, el CRISPR/Cas9 puede degradarse y los fragmentos resultantes pueden servir como relleno de ADN en el proceso de reparación del corte de la doble cadena e insertarse en sitios deseados o no deseados (Songstad *et al.*, 2017; Cabrera-Ponce *et al.*, 2019; Patel y Mishra, 2019).

A través del sistema de nucleasas de ingeniería se inducen pequeñas inserciones y eliminaciones (*indels*) o sustituciones en sitios de cromosomas no distinguibles de manera natural. Los aspectos legislativos de las plantas editadas son una preocupación pública importante (Songstad *et al.*, 2017). En cultivos que se reproducen sexualmente, los transgenes (*Cas9* y ARNg) y otros genes como los de pluripotencialidad (*ODP2* y *WUSCHEL*) del maíz, pueden eliminarse del genoma de la planta después de la formación de las semillas (Cabrera-Ponce *et al.*, 2019; Patel y Mishra, 2019). Sin embargo, esta estrategia no es de utilidad para plantas propagadas vegetativamente, y en la mayoría de los casos se requieren muchos años para alcanzar la madurez sexual (Artlip *et al.*, 2016).

Uso de CRISPR/Cas9 ARN (TECCRNA) como alternativa

Zhang *et al.* (2016) demostraron la producción de mutantes libres de transgenes (no transgénicas) en

with CRISPR/Cas9 DNA (TEECCDNA) or also in the form of RNA (TECCRNA) in *Triticum aestivum* hexaploid wheat and *T. turgidum* tetraploide hard wheat. Analyzed genes analyzed were: *TaGASR7-A1*, *B1* and *D1* (involved in the control of grain length and weight), *DEP1* (control of the inflorescence architecture), *NAC2* (branching of youngsters), *pin1* (adventitious root formation induced by auxins) and *TaLOX2* (grain development).

In these experiments a high efficiency of regeneration of mutated plants was obtained, with a reduced integration of the transgenes in the genome of the To plants, in the absence of selection with any marker. The use of RNA technology (TECCRNA) will produce free plants in the introduction of nucleic acids, because RNA molecules cannot be integrated into nuclear DNA. The mutation frequency using RNA was lower than with DNA.

Use of ribonucleoprotein complexes-CRISPR/Cas9

An alternative to eliminate possible side effects (indels formation) of the CRISPR/Cas9-rRNA within the genome during editing, is the use of a Cas9 protein and a pre-assembled guide RNA, to form a ribonucleoprotein (RNP), instead of a plasmid that codes for these components. Kim *et al.* (2014) demonstrated in human cells that the ribonucleoproteins complex acts by cutting the DNA on the chromosome immediately after transfection, and they are rapidly degraded by endogenous proteases, in order to reduce the risk of generating indels in edited plants.

Woo *et al.* (2015) used a pre-assembled complex of purified Cas9 protein and guide RNA in a ribonucleoprotein complex (RNP), in *Arabidopsis* protoplasts of tobacco, rice and lettuce, in the presence of PEG; besides, they used the T7E1 endonuclease to measure the frequency of mutation in the transfected cells, and found indels in the expected positions. When using the *BRI1* gene (insensitivity to brassinosteroids) in *Arabidopsis*, they showed that mutations occurred 24 h after transfection, which suggests that RNP cuts DNA immediately after it, and induces mutations before completing cell cycle. Similar results were obtained with the phytochrome B gene (*PHYB*). In edited lettuce plants in *BIN2* gene they found monoallelic mutants in 5.7% of calluses with biallelic mutations, produced seeds and

la generación T_0 . Lo anterior se realizó para varios genes de trigo con CRISPR/Cas9 ADN (TEECCDNA) o también en forma de ARN (TECCRNA) en trigo hexaploide *Triticum aestivum* y trigo duro *T. turgidum* tetraploide. Los genes analizados fueron: *TaGASR7-A1*, *B1* y *D1* (implicados en el control de longitud y peso del grano), *DEP1* (control de la arquitectura de la inflorescencia), *NAC2* (ramificación de hijuelos); *pin1* (formación de raíces adventicias inducidas por auxinas) y el *TaLOX2* (desarrollo del grano).

En estos experimentos se obtuvo una alta eficiencia de regeneración de plantas mutadas, con una reducida integración de los transgenes en el genoma de las plantas T_0 , en ausencia de selección con algún marcador. El uso de la tecnología con ARN (TECCRNA) producirá plantas libres en la introducción de ácidos nucleicos, debido a que las moléculas de ARN no pueden ser integradas en el ADN nuclear. La frecuencia de mutación usando ARN fue más baja que con ADN.

Uso de complejos de ribonucleoproteínas-CRISPR/Cas9

Una alternativa para eliminar los posibles efectos secundarios (formación de *indels*) de la CRISPR/Cas9-ARNg dentro del genoma durante la edición, es el uso de una proteína Cas9 y un ARN guía pre ensamblado, para formar una ribonucleoproteína (RNP), en lugar de un plásmido codificante para estos componentes. Kim *et al.* (2014) demostraron en células humanas que el complejo de ribonucleoproteínas actúa cortando el ADN en el cromosoma inmediatamente después de la transfección, y se degradan rápidamente mediante proteasas endógenas, para disminuir los riesgos de generación de indels en las plantas editadas.

Woo *et al.* (2015) usaron un complejo de pre ensamblados de la proteína purificada Cas9 y el ARN guía en un complejo de ribonucleoproteínas (RNP), en protoplastos de *Arabidopsis*, tabaco, arroz y lechuga, en presencia de PEG; además, usaron la endonucleasa T7E1 para medir la frecuencia de mutación en las células transfectadas, y encontraron indels en las posiciones esperadas. Al usar el gen *BRI1* (insensibilidad a brasinosteroides) en *Arabidopsis*, ellos mostraron que las mutaciones ocurrieron 24 h después de la transfección, lo cual sugiere que el RNP corta

demonstrated the mutated character in the progeny. With the previous results, the authors demonstrated that, by avoiding the use of recombinant DNA, plants edited by this process should be exempt from GMO legislation.

Liang *et al.* (2017) used preassembled complex of the purified Cas9 protein and the guide RNA in ribonucleoprotein complex (RNP), to edit the *TaGW2* and *TaGASR7* genes in two wheat varieties. They emphasized the main stages to generate the ribonucleoprotein-CRISPR/Cas9 complex. First, the preparation of RNP, the functional validation of RNP, the preparation of RNP binding and bombardment, plant regeneration and identification of mutants. The entire process was carried out in 7 to 9 weeks, and they observed a reduction in the frequency of mutations, compared to the method that uses DNA. The above is explained by the rapid degradation of the RNP, that is, the short half-life. As expected, it was shown that the plants regenerated by this process did not contain any transgene.

Svitashev *et al.* (2016) performed genome edition of *ALS2* gene of corn with the use of CRISPR/Cas9 through the ribonucleoproteins complex (RNP). *ALS2* gene was modified to replace a simple amino acid, proline instead of serine at position 165 and this simple change gives corn complete resistance to the chlorosulfuron herbicide. A single stranded oligo of 127 nucleotides was used to repair the DNA and was co-bombarded with Cas9-ALS-rRNA-complex-RNP and pluripotentiality genes (*ODP2* and *WUSCHEL*) from corn. As a result, chlorosulfuron resistant plants were regenerated. The mutation frequencies found when using DNA, compared to the RNP complex were similar, demonstrating the efficiency and high index of the cut-off activity of the RNP complex. The above is very important because through this procedure it is possible to generate non-transgenic mutagenesis, that is, free of foreign DNA and selection markers.

Increase efficiency of transformation and genetic edition of crops

Apoptosis, induced by *Agrobacterium tumefaciens* or by biobalistics, has been suggested as the origin of the recalcitrant character in some crop genotypes when they are genetically transformed or edited, due to the possibility of causing programmed cell death

el ADN inmediatamente después de ésta, e induce mutaciones antes de completar el ciclo de división celular. Resultados similares se obtuvieron con el gen del fitocromo B (*PHYB*). En plantas editadas de lechuga en el gen *BIN2* se encontraron mutantes monoalélicos en 5.7% de callos con mutaciones bialélicas, produjeron semillas y demostraron el carácter mutado en la progenie. Con los resultados anteriores los autores demostraron que, al evitar el uso de ADN recombinante, las plantas editadas por este proceso deberán estar exentas de la legislación de OGM.

Liang *et al.* (2017) usaron el complejo de preensamblados de la proteína purificada Cas9 y el ARN guía en complejo de ribonucleoproteínas (RNP), para editar los genes *TaGW2* y *TaGASR7* en dos variedades de trigo. Ellos enfatizaron las etapas principales para generar el complejo de ribonucleoproteínas-CRISPR/Cas9. Primero, la preparación del RNP, la validación funcional del RNP, la preparación de unión del RNP y el bombardeo, la regeneración de plantas y la identificación de los mutantes. El proceso completo se efectuó en 7 a 9 semanas, y ellos observaron una reducción en la frecuencia de mutaciones, comparado con el método que utiliza ADN. Lo anterior se explica por la rapidez de la degradación de los RNP, esto es, el corto tiempo de vida media. Como se esperaba, se demostró que las plantas regeneradas por este proceso no contenían algún transgene.

Svitashev *et al.* (2016) realizaron la edición del gen *ALS2* de maíz con el uso de CRISPR/Cas9 mediante el complejo de ribonucleoproteínas (RNP). El gen *ALS2* se modificó para sustituir un aminoácido simple, prolina por serina en la posición 165 y este cambio simple le confiere al maíz resistencia completa al herbicida clorosulfuron. Un oligo de hebra simple de 127 nucleótidos se usó para reparar el ADN y se co-bombardó con Cas9-ALS-ARNg-complejo-RNP y genes de pluripotencialidad (*ODP2* y *WUSCHEL*) del maíz. Como resultado, se regeneraron plantas resistentes al clorosulfuron. Las frecuencias de mutación encontradas al usar ADN, comparadas con el complejo RNP fueron similares, demostrando la eficiencia e índice alto de la actividad de corte del complejo RNP. Lo anterior es muy importante debido a que mediante este procedimiento es posible generar mutagénesis no transgénica, es decir, libre de ADN foráneo y de marcadores de selección.

(Hansen, 2000). However, another key factors are the culture media and environment (temperature, light), which have a very important function in the activation of the pluripotentiality of plant cells.

The understanding of a genetic network between cytokinin and auxin signaling, as well as the rest of the growth regulators (abscisic acid, brassinosteroids, ethylene, gibberellins, jasmonates, salicylates and karrikines), is necessary to reprogram recalcitrant genotypes and can be manipulated. As an example of the above, several genomic editing investigations of maize have successfully used transcription factors involved in the generation of pluripotent stem cells (*WUSCHEL* and *ODP2*). The results generated have had important practical applications, such as obtaining waxy corn, resistance to herbicides, drought and complex feature loci (Svitashev *et al.*, 2015, Svitashev *et al.*, 2016, Chilcoat *et al.*, 2017; Shi *et al.*, 2017).

CONCLUSIONS

Genome edited plants are the technological result of years of evolution as a result of understanding in the domestication of plants and the beginning of agriculture, plant breeding and the genomic age. By understanding the laws of inheritance, genetics, natural and induced mutagenesis, it was possible to generate varieties of commercial plants with necessary agronomic characteristics, for sustainable agriculture. At present, the use of technologies such as genome sequencing, gene identification, genetic and proteomic interaction network analysis have allowed varieties to be obtained, through genome editing with specific modifications of a plant trait.

—End of the English version—

-----*-----

Incremento en la eficiencia de transformación y edición genética de cultivos

La apoptosis, inducida por *Agrobacterium tumefaciens* o por biobalística, se ha sugerido como el origen del carácter recalcitrante en algunos genotipos

de cultivos cuando se transforman o editan genéticamente, por la posibilidad de ocasionar muerte celular programada (Hansen, 2000). Sin embargo, otros factores clave son los medios de cultivo y el ambiente (temperatura, luz), los cuales tienen una función muy importante en la activación de la pluripotencialidad de las células vegetales.

La comprensión de una red genética entre la señalización de citocininas y auxinas, así como los demás reguladores del crecimiento (ácido abscísico, brasinosteroides, etileno, giberelinas, jasmonatos, salicilatos y karrikininas), es necesaria para reprogramar genotipos recalcitrantes y manipulables. Como un ejemplo de lo expuesto, varias investigaciones de edición genómica del maíz han utilizado con éxito factores de transcripción involucrados en la generación de células madre pluripotentes (*WUSCHEL* y *ODP2*). Los resultados generados han tenido importantes aplicaciones prácticas, como la obtención de maíz ceroso, resistencia a herbicidas, a sequía y loci de rasgos complejos (Svitashev *et al.*, 2015; Svitashev *et al.*, 2016; Chilcoat *et al.*, 2017; Shi *et al.*, 2017).

CONCLUSIONES

Las plantas editadas en el genoma son el resultado tecnológico de años de evolución, producto del entendimiento en la domesticación de las plantas e inicio de la agricultura, el fitomejoramiento y la era genómica. Al entender las leyes de la herencia, la genética, la mutagénesis natural e inducida, se logró generar variedades de plantas comerciales con características agronómicas necesarias, para una agricultura sostenible. En la actualidad el uso de tecnologías como secuenciación de genomas, identificación de genes, análisis de redes de interacción genética y proteómica, han permitido la obtención de variedades a través la edición del genoma con modificaciones específicas de un rasgo de la planta.

LITERATURA CITADA

- Artlip, T. S., M. E. Wisniewski, R. Arora, and J. L. Norelli. 2016. An apple rootstock overexpressing a peach CBF gene alters growth and flowering in the scion but does not impact cold hardiness or dormancy. *Hort. Res.* 3: 16006.
- Blanvillain-Baufumé, S., M. Reschke, M. Solé, F. Auguy, H. Doucoure, B. Szurek, and J. Boch. 2017. Targeted promoter editing for rice resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* reveals differential activities for SWEET 14-inducing TAL effectors. *Plant Biotechnol.* 15: 306-317.
- Boch, J., and U. Bonas. 2010. *Xanthomonas* AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Ann. Rev. Phytopathol.* 48: 419-436.
- Bogdanove, A. J., S. Schornack, and T. Lahaye. 2010. TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. *Current Opinion Plant Biol.* 13: 394-401.
- Broll, H., Braeuning, A., and Lampen, A. 2019. European Court of Justice decision for genome editing: Consequences on food/feed risk assessment and detection. *Food Control* 104: 288-291.
- Brookes, G., and P. Barfoot. 2016. Global income and production impacts of using GM crop technology 1996–2014. *GM Crops Food.* 7: 38–77.
- Cabrera-Ponce, J. L., E. Valencia-Lozano, E., and D. L. Trejo-Saavedra. 2019. Chapter 3—Genetic modifications of corn. *In: Corn*, 3rd ed. Serna-Saldivar, S.O., Ed. AACC International Press: Oxford, UK. pp: 43–85.
- Carroll, D. 2011. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics.* 188: 773–782.
- Chilcoat, D., Z. B. Liu, and J. Sander. 2017. Use of CRISPR/Cas9 for crop improvement in maize and soybean. *Progress Molecular Biol. Trans. Sci.* 149: 27-46.
- Cho, S. W., S. Kim, J. M. Kim, and J. S. Kim. 2013. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat. Biotechnol.* 31: 230-232.
- DeFrancesco, L. 2011. Move over ZFNs: a new technology for genome editing may put the zinc finger nuclease franchise out of business, some believe. Not so fast, say the finger people. *Nature Biotechnol.* 29: 681-685.
- D'Halluin, K., and R. Ruiter. 2013. Directed genome engineering for genome optimization. *Int. J. Dev. Biol.* 57: 621-627.
- Gao, H., J. Smith, M. Yang, S. Jones, V. Djukanovic, M. G. Nicholson, M. G., and L. A. Lyznik. 2010. Heritable targeted mutagenesis in maize using a designed endonuclease. *Plant J.* 61: 176-187.
- Gupta, M., R. C. DeKolver, A. Palta, C. Clifford, S. Gopalan, J. C. Miller, and J. Flook. 2012. Transcriptional activation of *Brassica napus* β -ketoacyl-ACP synthase II with an engineered zinc finger protein transcription factor. *Plant Biotechnol.* 10: 783-791.
- Hansen, G. 2000. Evidence for *Agrobacterium*-induced apoptosis in maize cells. *Mole Plant-microbe Interact.* 13: 649-657.
- Haun, W., A. Coffman, B. M. Clasen, Z. L. Demorest, A. Lowy, E. Ray, and L. Mathis. 2014. Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family. *Plant Biotechnol.* 12: 934-940.
- Hirano, T., Y. Kazama, K. Ishii, S. Ohbu, Y. Shirakawa, and T. Abe. 2015. Comprehensive identification of mutations induced by heavy-ion beam irradiation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 82: 93-104.
- Hockemeyer, D., H. Wang, S. Kiani, C. S. Lai, Q. Gao, J. P. Casady, and B. Zeitler. 2011. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat. Biotechnol.* 29: 731-734.
- Kim, S., D. Kim, D., S. W. Cho, S. W.J. Kim, J., and J. S. Kim, J. S. 2014. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Research* 24: 1012-1019.
- Liang, Z., K. Chen, T. Li, Y. Zhang, Y. Wang, Q. Zhao, and C. Gao. 2017. Efficient DNA-free genome editing of bread

- wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat. Commun.* 8: 1-5.
- Mahfouz, M. M., L. Li, M. Shamimuzzaman, A. Wibowo, X. Fang, and J. K. Zhu. 2011. De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108: 2623-2628.
- Meyer, R. S., and M. D. Purugganan. 2013. Evolution of crop species: genetics of domestication and diversification. *Nat. Rev. Genet.* 14: 840-852.
- Parrott, W. 2018. Outlaws, old laws and no laws: the prospects of gene editing for agriculture in the USA. *Physiol. Plant.* 164: 406-411.
- Patel, J., and Mishra, A. 2019. Genome editing: Advances and prospects. *In: Plant Biotechnology: Progress in Genomic Era.* Springer, Singapore. pp: 147-174.
- Sauer, N. J., J. Mozoruk, R. B. Miller, R. B., Z. J. Warburg, K. A. Walker, P. R. Beetham, and G. F. Gocal. 2016. Oligonucleotide-directed mutagenesis for precision gene editing. *Plant Biotechnol.* 142: 496-502.
- Shan, Q., Y. Zhang, K. Chen, K. Zhang, and C. Gao. 2015. Creation of fragrant rice by targeted knockout of the OsBADH2 gene using TALEN technology. *Plant Biotechnol.* 13: 791-800.
- Shi, J., H. Gao, H. Wang, H. R. Lafitte, R. L. Archibald, M. Yang, and J. E. Habben. 2017. ARGOS 8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnol.* 152: 207-216.
- Songstad, D. D., J. F. Petolino, D. F. Voytas, and N. A. Reichert. 2017. Genome editing of plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 36: 1-23.
- Suprasanna, P., S. J. Mirajkar, and S. G. Bhagwat. 2015. Induced mutations and crop improvement. *In: Bahadur, B., V. M. Rajam, L. Sahijram, and K. V. Krishnamurthy (eds).* *Plant Biology and Biotechnology. Vol. I. Plant Diversity, Organization, Function and Improvement.* Springer India. pp: 593-617.
- Svitashev, S., J. Young, C. Schwartz, H. Gao, S. C. Falco, and A. M. Cigan. 2015. Targeted mutagenesis, precise gene editing and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA. *Plant Physiol.* 169: 931-945.
- Svitashev, S., C. Schwartz, B. Lenderts, J. K. Young, and A. M. Cigan. 2016. Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat. Commun.* 7: 1-7.
- Tanaka, A., N. Shikazono, and Y. Hase. 2010. Studies on biological effects of ion beams on lethality, molecular nature of mutation, mutation rate, and spectrum of mutation phenotype for mutation breeding in higher plants. *J. Radiat. Res.* 51: 223-233.
- Urnov, F. D., P. C. Ronald, and D. Carroll. 2018. A call for science-based review of the European court's decision on gene-edited crops. *Nat. Biotechnol.* 36: 800-802.
- Waltz, E., 2016. CRISPR-edited crops free to enter market, skip regulation. *Nat. Biotechnol.* 34: 582-582.
- Waltz, E. 2016. Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation. *Nature News.* 532(7599), 293.
- Woo, J. W., J. Kim, S. I. Kwon, C. Corvalán, S. W. Cho, H. Kim, and J. S. Kim. 2015. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat. Biotechnol.* 33: 1162-1164.
- Zhang, Y., F. Zhang, X. Li, J. A. Baller, Y. Qi, C. G. Starker, and D. F. Voytas. 2013. Transcription activator-like effector nucleases enable efficient plant genome engineering. *Plant Physiol.* 161: 20-27.
- Zhang, Y., Z. Liang, Y. Zong, Y. Wang, J. Liu, K. Chen, and C. Gao. 2016. Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. *Nat. Commun.* 7: 12617. 1-8.
- Zhang, J., H. Zhang, J. R. Botella, and J. K. Zhu. 2018. Generation of new glutinous rice by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the Waxy gene in elite rice varieties. *J. Integrative Plant Biol.* 60: 369-375.

