

## Edición génica con el sistema CRISPR/Cas9: historia de su descubrimiento y alcances en agricultura

Matías Nicolás González<sup>1,2\*</sup>, Gabriela Alejandra Massa<sup>1,2,3</sup> y Sergio Enrique Feingold<sup>1</sup>

<sup>1</sup>) Laboratorio de Agrobiotecnología, IPADS (INTA - CONICET), Balcarce, Argentina.

<sup>2</sup>) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina.

<sup>3</sup>) Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata, Balcarce, Argentina.

(\*) [gonzalez.matiasn@inta.gob.ar](mailto:gonzalez.matiasn@inta.gob.ar)

Recibido: 13/04/2021

Aceptado: 27/04/2021

### Resumen

La conversión del sistema inmune procarionta CRISPR/Cas9 en una herramienta molecular para edición génica representa el avance tecnológico más destacado de la última década, y ha revolucionado tanto la investigación básica como el desarrollo de aplicaciones en diversas áreas de las ciencias de la vida. Los alcances de esta tecnología han sido reconocidos con el Premio Nobel en Química del año 2020. En las especies vegetales, CRISPR/Cas9 permite la modificación de secuencias genómicas con una eficiencia y especificidad sin precedentes, lo que permite la creación de genotipos con caracteres beneficiosos que permiten afrontar la creciente demanda global de alimentos en un marco de adversidades crecientes dadas por el cambio climático. La creación de esta herramienta y los avances obtenidos con su empleo, no hubiesen sido posibles sin el fundamental aporte de las investigaciones pioneras que permitieron el descubrimiento de los sistemas CRISPR en procariontes. En este artículo, abordamos la historia del descubrimiento de CRISPR hasta el punto de inflexión en su adopción como sistema para edición génica y discutimos su potencial como herramienta en el mejoramiento de los cultivos y sus perspectivas a futuro.

**Palabras claves:** CRISPR/Cas9; edición génica; mejoramiento de cultivos; biotecnología

### Abstract

The adoption of the prokaryotes-immune system CRISPR/Cas9 as a genome-editing tool represents the most outstanding technological advance of the last decade and has revolutionized both basic research and applied developments in many areas of life sciences. The recognition of this technology was reflected with the 2020 Nobel Prize in Chemistry. In plant research, CRISPR/Cas9 allows for the first time the precise modification of genomic sequences with unprecedented efficiency and specificity, allowing the creation of genotypes with beneficial traits that would allow facing the growing global food demand under the constraints of a global warming scenario. The development of this technology and the advances obtained with its use would not have been possible without the fundamental contribution of the basic research behind the discovery of the CRISPR systems in prokaryotes. In this article, we address the history of the discovery of CRISPR into the inflection point of its adoption as a genome-editing tool and discuss its potential in crop breeding and its future prospects.

**Keywords:** CRISPR/Cas9; Genome-editing; Crop breeding; Biotechnology

### Introducción

La edición génica constituye uno de los avances más notables de la biotecnología moderna en la modificación del ADN de las células eucariotas, permitiendo la introducción de inserciones o deleciones, la sustitución de fragmentos, la introducción de nuevo material genético de forma dirigida, e incluso la modificación de secuencias a nivel de nucleótidos individuales<sup>1</sup>. La estrategia básica de la edición génica involucra la introducción de cortes en la doble hebra de ADN (DSB, del inglés *double-stranded breaks*) en un punto definido del ge-

noma. Para preservar su integridad, las células emplean mecanismos endógenos que les permiten reparar los DSB previo a la replicación del genoma. Los principales mecanismos de reparación de DSB en las células eucariotas son la unión de extremos no-homólogos (NHEJ, del inglés *non-homologous end joining*) y la recombinación homóloga (HR, del inglés *homologous recombination*)<sup>2</sup>. Como resultado de una reparación imprecisa mediada por NHEJ se pueden obtener pequeñas inserciones o deleciones en el sitio de unión, lo que puede ser explotado para producir la pérdida de función de genes especí-



**Doctorando Lic. Matías Nicolás González.** Laboratorio de Agrobiotecnología, IPADS (INTA-CONICET), Balcarce, Argentina.



**Dra. Gabriela Alejandra Massa.** Laboratorio de Agrobiotecnología, IPADS (INTA-CONICET), Balcarce, Argentina.



**Dr. Sergio Enrique Feingold.** Laboratorio de Agrobiotecnología, IPADS (INTA-CONICET), Balcarce, Argentina.

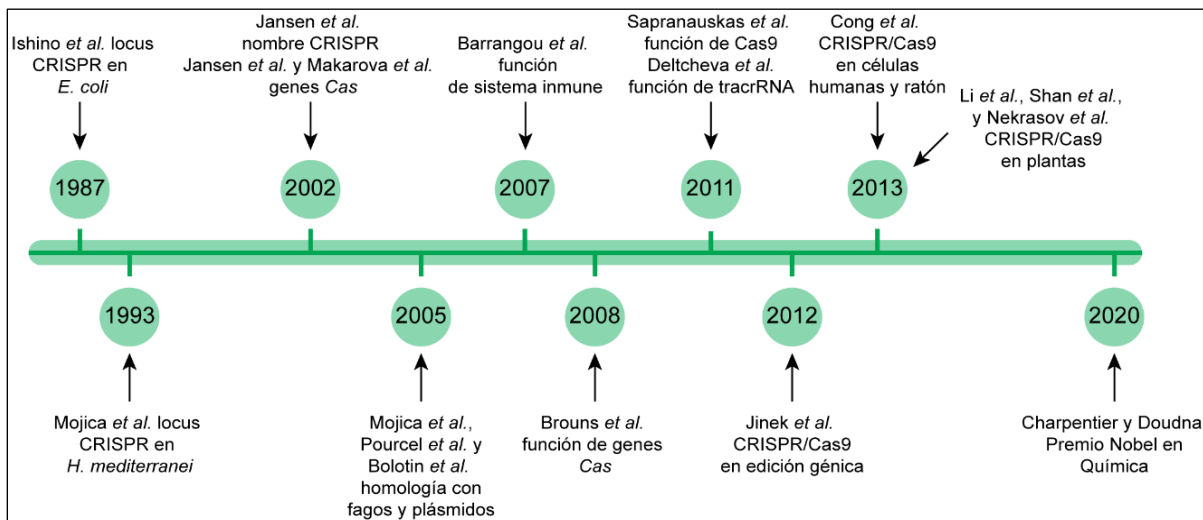


Fig. 1: Línea de tiempo con los hitos más destacados del descubrimiento de CRISPR/Cas9.

ficos, debido a la alteración de los marcos de lectura que conlleven a la generación de codones de terminación prematuros, o la pérdida de función de la proteína resultante, por la eliminación de aminoácidos clave a nivel funcional y/o estructural. Adicionalmente, la reparación por NHEJ permite la obtención de re-arreglos cromosómicos<sup>3</sup>. Por otro lado, para que se lleve a cabo la reparación mediada por HR es necesaria la presencia dentro de la célula de un fragmento de ADN con secuencia homóloga al sitio de corte, lo que puede ser utilizado para la integración dirigida de secuencias ectópicas o la corrección de mutaciones preexistentes<sup>4</sup>.

Los primeros sistemas de edición génica utilizados en los organismos eucariotas incluyen a las meganucleasas<sup>5</sup>, TALEN (del inglés *transcription activator-like effector nucleases*) y ZFN (del inglés *zinc finger nucleases*)<sup>6</sup>. Estos sistemas implican el reconocimiento específico de la secuencia blanco de ADN a través de un dominio proteico, lo que presenta limitaciones asociadas a la complejidad de su diseño y la validación de su actividad. Aunque los sistemas TALEN y ZFN aún se utilizan dentro de la comunidad científica de diversas áreas, las mencionadas limitaciones hacen que su adopción se encuentre lejos de ser considerada rutinaria<sup>7</sup>. Por el contrario, CRISPR/Cas (del inglés, *clustered regularly interspaced short palindromic repeats and CRISPR-associated proteins*), basado en el reconocimiento de secuencias blanco de ADN guiado por ARN, representa el sistema de edición génica más versátil descubierto en la historia de la biología molecular, debido a que puede ser aplicado para la modificación de genomas de plantas y animales (incluyendo humanos) con facilidad, precisión y eficiencia sin precedentes<sup>8</sup>. A menos de una década desde su adopción como herramienta para edición génica<sup>9</sup>, el sistema CRISPR/Cas9 originado de la bacteria *Streptococcus pyogenes* ha revolucionado tanto la investigación básica como la aplicada en las áreas de medicina, mejoramiento animal y vegetal, entre otras, lo que le valió a dos de sus desarrolladoras, Emmanuelle Charpentier (actualmente en el Instituto Max Planck de Berlín, Alemania) y Jennifer Doudna (Universidad

de California en Berkeley, Estados Unidos) el Premio Nobel en Química del año 2020<sup>7</sup>.

En este artículo abordamos brevemente la historia detrás del descubrimiento del sistema CRISPR/Cas9, su biología y adopción como herramienta para edición génica y proveemos ejemplos concretos de sus aplicaciones más notables en agricultura. Por otro lado, discutimos las perspectivas a futuro en el uso de ésta y otras tecnologías desarrolladas recientemente a partir de CRISPR/Cas9, en el desarrollo de nuevas variedades de cultivos.

### La historia detrás de CRISPR/Cas9

La figura 1 muestra una línea de tiempo con los hitos más destacados en el descubrimiento del sistema CRISPR/Cas9 y su subsiguiente transformación en una herramienta para edición génica. Como muchos otros de los más valiosos descubrimientos científicos, el hallazgo de CRISPR ocurrió de manera accidental. Fue a mediados de los 1980's, cuando Ishino *et al.* (1987) estudiaban un gen relacionado con la formación de isoenzimas de la fosfatasa alcalina (AP) en la bacteria *Escherichia coli*. En aquel trabajo, los investigadores aislaron y secuenciaron el gen *iap* (codificante de una proteasa aparentemente involucrada en la conversión isoenzimática de la AP), encontrando río abajo de dicha secuencia una estructura inusual, conformada por una secuencia corta repetida varias veces de forma directa, inter-espaciada por secuencias no conservadas<sup>10</sup>. Esta estructura fue tan inesperada, que los autores del trabajo la mencionaron brevemente en la discusión, a pesar de no haber identificado su función biológica<sup>10</sup>.

El siguiente avance en la historia de CRISPR se dio en 1993, cuando Mojica *et al.* identificaron repeticiones directas similares a las observadas por Ishino en el genoma de una especie de arquea, *Haloflex mediterranei*, durante el estudio de los mecanismos de regulación de la expresión génica que permi-

<sup>7</sup> <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2020/press-release/>

ten a esta arquea adaptarse a distintas condiciones de salinidad<sup>11</sup>. Más importante aún, los autores demostraron mediante técnicas de *Northern blot*, que estas repeticiones son capaces de transcribirse a ARN. Desde entonces, los avances en las técnicas de secuenciación logrados durante la década de 1990 pusieron a disponibilidad de los científicos datos de secuenciación de muchos genomas, a partir de los que se detectaron *loci* de repeticiones directas en múltiples especies de bacterias y arqueas, descritas bajo diversos nombres en la literatura<sup>12</sup>. Su presencia en dos de los tres dominios de la vida, llamó el interés de muchos grupos de investigación especializados en microbiología, que se dedicaron a identificar su función biológica. En 2002, Jensen *et al.* realizaron estudios de genómica comparativa y llegaron a la conclusión de que estos *loci* guardan ciertas características conservadas en todos los genomas: i) contienen múltiples repeticiones directas conservadas; ii) las repeticiones están inter-espaciadas por secuencias no conservadas; iii) se localizan en regiones inter-génicas; y iv) una secuencia común de entre 300-500 pb se ubica río abajo o arriba del grupo de repeticiones<sup>13</sup>. Para resumir las características observadas, los autores propusieron por primera vez el nombre CRISPR, que fuera rápidamente aceptado por la comunidad científica que trabajaba en estas secuencias. En ese mismo trabajo y en otro publicado en la misma época, se identificaron los genes *Cas*, presentes en las regiones adyacentes a los *loci* CRISPR<sup>13,14</sup>. El estudio de la secuencia proteica predicha a partir de estos genes, permitió sugerir que codifican para enzimas relacionadas con el metabolismo del ADN, posiblemente relacionadas con un sistema de reparación, recombinación o regulación de la transcripción<sup>14</sup>. El punto de inflexión en la determinación de la función biológica de los *loci* CRISPR se dio en 2005 cuando de forma independiente dos trabajos publicados por Mojica *et al.* y Pourcel *et al.*, demostraron que las secuencias no conservadas que separan las repeticiones directas en el locus CRISPR guardan homología con genomas de bacteriófagos y plásmidos exógenos<sup>15,16</sup>. Los autores de ambos trabajos, propusieron además que las cepas de bacterias que conservan las secuencias espaciadoras homólogas a los genomas de los fagos, no son susceptibles a su infección, quedando establecido que CRISPR constituiría un sistema inmune. A su vez, en ambos trabajos se propuso que los genes *Cas* tendrían algún rol en la función de CRISPR como sistema inmune. Estas observaciones fueron confirmadas por el trabajo de Bolotin *et al.* (2005)<sup>17</sup>. La función de CRISPR fue experimentalmente probada por Barrangou *et al.* en 2007. Trabajando con la bacteria *Streptococcus thermophilus* demostraron que CRISPR es esencial para prevenir las contaminaciones con bacteriófagos en cultivos bacterianos benéficos para la preparación de yogurt, quesos y productos relacionados<sup>18</sup>. Los autores demostraron que las inserciones de fragmentos del ADN de bacteriófagos entre las repeticiones directas del locus CRISPR permiten a la bacteria resistir a la infección del fago correspondiente. A su vez, la eliminación de esta secuencia en el fago, restaura la susceptibilidad de la bacteria a su infección<sup>18</sup>. El mecanismo por el cual la bacteria es capaz de con-

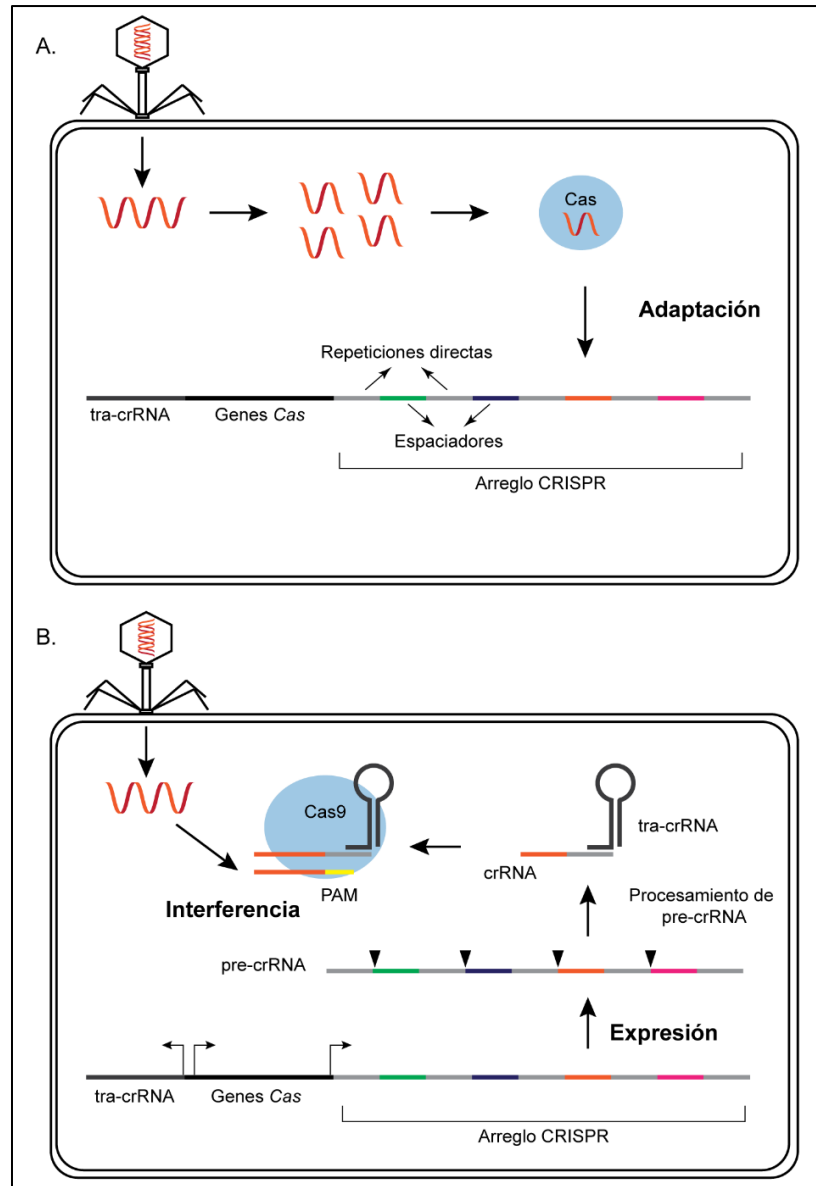
trarrestar la infección por el fago, fue descrito más tarde por Brouns *et al.* (2008). Los autores fueron capaces de reconstruir el sistema inmune de la bacteria *E. coli*, demostrando que moléculas cortas de ARN procesadas a partir del locus CRISPR interactúan con las proteínas codificadas en los genes *Cas* para mediar la respuesta antiviral<sup>19</sup>. Posteriormente, la expresión del sistema CRISPR/Cas de *S. thermophilus* en *E. coli* demostró protección heteróloga a la infección por fagos. Este trabajo marcó un hito muy importante en el desarrollo de una herramienta para edición génica, ya que demostró que Cas9, la enzima codificada en el gen *Cas9* de *S. thermophilus* es la única proteína necesaria en esta bacteria para mediar la respuesta inmune<sup>20</sup>. Ese mismo año, un grupo de investigadores liderados por Emmanuelle Charpentier, trabajando primero en la Universidad de Viena, Austria, y posteriormente en la Universidad de Umeå, Suecia, lograron identificar un componente fundamental del sistema CRISPR/Cas de la bacteria *Streptococcus pyogenes*. Al igual que su especie emparentada *S. thermophilus*, *S. pyogenes* requiere solo de la nucleasa Cas9 para mediar la respuesta inmune frente a bacteriófagos, además de las secuencias de ARN cortas codificadas en el locus CRISPR. Los investigadores lograron identificar un tercer componente constituido por una molécula de ARN no codificante (denominado tra-crRNA) cuyo rol es clave en la maduración de las moléculas pequeñas de ARN que median la respuesta inmune<sup>21</sup>. Este descubrimiento llevó a Charpentier a establecer una colaboración con Jennifer Doudna, de la Universidad de California en Berkeley, Estados Unidos, una reconocida bioquímica con vasta experiencia en ARN. Trabajando en conjunto, lograron reformular el sistema CRISPR/Cas9 de *S. pyogenes* para convertirlo en una herramienta programable de edición génica constituida por dos componentes<sup>9</sup>. Inmediatamente, el sistema CRISPR/Cas9 demostró su potencial en la edición de genes de células eucariotas; en mamíferos primero<sup>22</sup>, y en plantas más tarde<sup>23-25</sup>. Desde entonces, su utilización ha permitido innumerables investigaciones y aplicaciones en áreas de medicina, mejoramiento animal y agricultura<sup>1</sup>.

### **Biología del sistema CRISPR/Cas9 y creación de una herramienta para edición génica**

CRISPR/Cas fue descubierto como una forma de sistema inmune adaptativo presente en muchas bacterias y la mayoría de las arqueas. En general, se distinguen dos partes fundamentales en CRISPR/Cas: i) los genes *Cas*, que codifican proteínas involucradas en la adquisición de nuevas secuencias de ADN invasor y en la protección frente a la reinfección; y ii) el arreglo CRISPR que consiste en secuencias conservadas denominadas repeticiones directas, separadas por secuencias no conservadas de una longitud fija denominadas espaciadores. El arreglo CRISPR provee de una memoria inmune a la célula de invasiones de ADN previas<sup>26</sup>. El sistema inmune CRISPR/Cas9, perteneciente a la bacteria *S. pyogenes* (figura 2) ha sido uno de los sistemas mejor estudiados y su completa descripción en el año 2011<sup>21</sup>, llevó al desarrollo de una herramienta

de edición génica<sup>9</sup>. En la bacteria, el mecanismo completo de defensa se desarrolla en tres etapas, denominadas de adaptación, de expresión y de interferencia<sup>8</sup>. Durante el proceso de adaptación, iniciado ante la primera exposición de la célula al fago o plásmido, una secuencia corta del ADN foráneo (espaciador) es integrada al arreglo CRISPR y separada del resto por repeticiones directas (figura 2A). Durante la fase de expresión, el arreglo CRISPR se transcribe para dar una única molécula larga de ARN, denominada ARN precursor CRISPR

(pre-crRNA), la cual es posteriormente procesada por ARNasas en moléculas cortas de ARN CRISPR maduros (crRNA). En su extremo 5' el crRNA posee la secuencia complementaria al espaciador integrado durante la etapa de inmunización, mientras que en el extremo 3' el crRNA posee una secuencia complementaria a la repetición directa. Durante la etapa de interferencia seguida a la segunda invasión del patógeno, el crRNA es unido por una segunda molécula de ARN no codi-



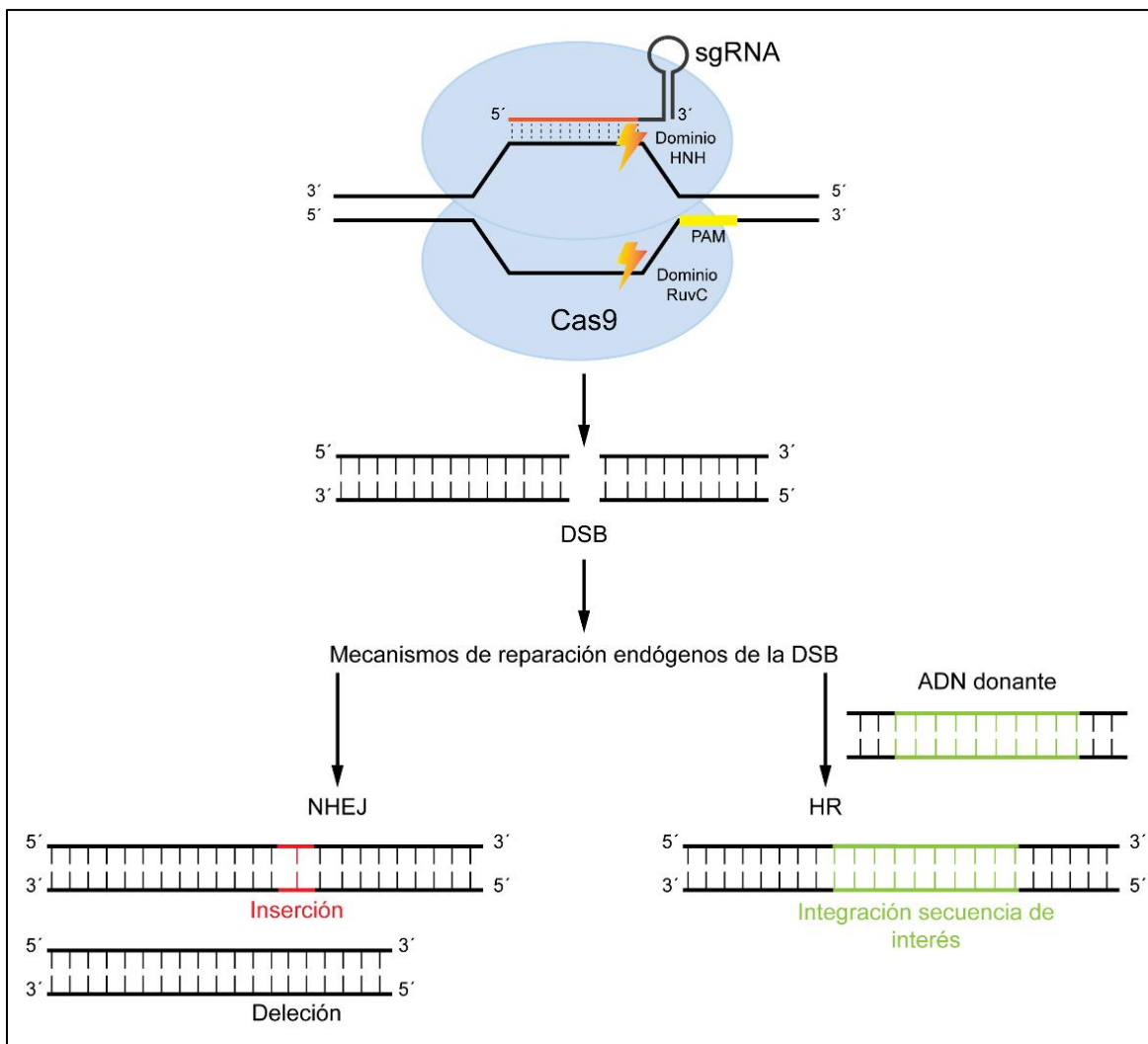
**Fig. 2:** El sistema inmune adaptativo CRISPR/Cas9 de *Streptococcus pyogenes*. **(A)** El locus CRISPR consta de un arreglo de secuencias cortas repetitivas (repeticiones directas) inter-espaciadas por fragmentos cortos no repetitivos (espaciadores), y de los genes asociados (genes *Cas*). Previo a los genes *Cas* se encuentra codificado el ARN transactivador del ARN CRISPR (*tra-crRNA*) que posee homología con las repeticiones directas. Durante el mecanismo de adaptación, un nuevo espaciador (barra anaranjada) originado del material genético invasor, es incorporado al arreglo CRISPR por enzimas codificadas en los genes *Cas*. **(B)** Durante la etapa de expresión, el nuevo espaciador es transcrito en conjunto con los otros espaciadores en una molécula de ARN larga denominada precursor de ARN CRISPR (*pre-crRNA*), el cual es procesado por ARNasas (puntas de flecha invertidas) en moléculas cortas maduras (*crRNA*), que contienen la secuencia del espaciador y una repetición directa (barra gris). El *tra-crRNA* se transcribe independientemente e hibrida por complementariedad de bases con la repetición directa contenida en el *crRNA*. Durante la interferencia, la estructura híbrida *crRNA/tra-crRNA* es incorporada por la nucleasa efectora Cas9, la cual es capaz de cortar el ADN invasor ante una segunda exposición, en un sitio complementario a la secuencia del espaciador, localizada río arriba de una secuencia PAM (barra amarilla).



ficante, denominada ARN transactivador del ARN CRISPR (tra-crRNA), el cual hibrida con el extremo 3' del crRNA. Ambos forman una estructura secundaria específica, capaz de reclutar a la nucleasa efectora Cas9, y el complejo resultante tiene la capacidad de monitorear secuencias de ADN, hasta hibridar con su complementaria en el ADN del patógeno (denominada protoespaciador) y producir el corte para su degradación. Para la identificación del ADN foráneo es necesario en la proximidad del protoespaciador, un motivo corto y conservado denominado motivo adyacente al protoespaciador (PAM, por sus siglas en inglés) (figura 2B). Este motivo se localiza exclusivamente en la secuencia del ADN foráneo y no así en el arreglo CRISPR, lo que ha sido propuesto como un mecanismo que evita al sistema interferir contra el propio

ADN del hospedador.

El paso fundamental dado en la creación de una herramienta programable de edición génica, se dio al combinar el crRNA y el tra-crRNA en una única molécula de ARN guía (sgRNA), quedando establecido un sistema de dos componentes (figura 3)<sup>9</sup>. Modificando la secuencia correspondiente al espaciador dentro de dicho sgRNA, se puede reprogramar el sistema y guiar la nucleasa Cas9 hacia cualquier secuencia de ADN (con la existencia de un motivo PAM como único requisito) para introducir cortes en la doble hebra<sup>8</sup>. La subsecuente reparación del corte por los mecanismos de reparación celular del ADN (NHEJ o HR), posibilita la introducción de modificaciones en la secuencia blanco (figura 3).



**Fig. 3:** Edición génica mediada por CRISPR/Cas9. La nucleasa Cas9 es guiada por el sgRNA hasta el sitio blanco, complementario a la secuencia del espaciador (línea anaranjada). El dominio HNH y el dominio RuvC producen el corte de la hebra blanco y no-blanco, respectivamente. La presencia de una secuencia PAM (-NGG) es necesaria para el correcto reconocimiento y función por parte de la nucleasa. El corte resultante en la doble hebra de ADN (DSB), es reparado por uno de dos mecanismos endógenos de la célula del huésped. En ausencia de un fragmento de ADN de secuencia homóloga, el mecanismo prevalente es la unión de extremos no homólogos (NHEJ) que puede conllevar a inserciones o deleciones en el sitio de unión. En presencia de un fragmento de ADN que contiene una secuencia de interés flanqueada por secuencias con homología al sitio circundante al corte (ADN donante), puede iniciarse el mecanismo de recombinación homóloga (HR), para producir la integración de la secuencia de interés, que puede corresponder al mismo organismo o a otro diferente, dando lugar a un reemplazo alélico o a un evento transgénico, respectivamente.

## Aplicaciones de CRISPR/Cas9 en agricultura

Desde sus primeras aplicaciones en plantas en 2013<sup>27</sup>, el sistema CRISPR/Cas9 ha acelerado la investigación básica en especies vegetales y ha provisto de una herramienta poderosa para ser aplicada al mejoramiento de muchas especies de cultivos de importancia económica, como arroz, trigo, maíz, soja, tomate y papa (para revisiones recientes consultar<sup>28-34</sup>). La combinación entre los avances en la secuenciación de genomas y el surgimiento de CRISPR/Cas9 como herramienta de edición génica, permite la creación de nuevos genotipos con características beneficiosas, haciendo foco en caracteres que tiendan a mejorar la calidad de los productos de cosecha y la sostenibilidad productiva y ambiental. Debido a que el mecanismo de NHEJ es la principal vía de reparación de DSB en células somáticas vegetales, el sistema CRISPR/Cas9 ha sido primordialmente utilizado para crear pequeñas inserciones o deleciones en puntos específicos del genoma, que permiten la eliminación de elementos genéticos que otorgan características indeseables<sup>34</sup>. Sin embargo, también se ha utilizado para la introducción de modificaciones precisas que otorgan una ganancia de función a través del mecanismo de HR<sup>4</sup>. Las principales aplicaciones de CRISPR/Cas9 en mejoramiento se han enfocado en obtener aumentos de rendimiento, mayor calidad nutricional y/o industrial, y resistencia de los cultivos a estreses bióticos y abióticos. En esta sección, se brindan ejemplos concretos para demostrar el alcance de esta tecnología en el mejoramiento de algunas de las especies de los cultivos más importantes para la actividad agrícola mundial.

### *Incremento en el rendimiento*

Uno de los principales desafíos en el mejoramiento de cultivos, es obtener incrementos y estabilidad en los rendimientos que permitan enfrentar la creciente demanda de alimentos y combustibles de origen vegetal<sup>35</sup>. Rodríguez-Leal *et al.* (2017) utilizaron el sistema CRISPR/Cas9 para generar variantes de elementos regulatorios de genes que controlan el tamaño del fruto, la ramificación de las inflorescencias y la arquitectura de la planta, tres de los más importantes caracteres que afectan la productividad en tomate<sup>36</sup>. Mediante la utilización de múltiples sgRNAs dirigidos a la región promotora del gen *CLV3* (que controla el número de compartimentos para las semillas del tomate y, por lo tanto, el tamaño del fruto), los autores lograron generar distintas variantes del promotor obteniendo plantas con un número mayor de órganos florales y de compartimentos de semillas en el fruto, lo que resultó en un aumento en el tamaño del mismo. En el mismo trabajo, los autores editaron las regiones promotoras de los genes *S* (controlan el desarrollo de inflorescencias promoviendo la maduración de los meristemas) y *SP* (codifica para un represor de la floración que mantiene el crecimiento vegetativo), obteniendo plantas editadas con aumento del número de ramificaciones en las inflorescencias (lo que incrementa el número de frutos por planta), y plantas editadas con alteraciones en la arquitectura del tallo y en el número de inflorescencias, respectivamente<sup>36</sup>.

El arroz, una de las principales fuentes de alimento del mundo, ha sido uno de los cultivos en los que se ha aplicado ampliamente el mejoramiento mediante técnicas de edición génica, debido a que posee un genoma pequeño, alta eficiencia de transformación, y disponibilidad de datos genómicos<sup>37</sup>. Utilizando el sistema CRISPR/Cas9, Zhou *et al.* (2019) editaron los genes *OsGS3*, *OsGW2* y *OsGn1a*, que regulan negativamente el tamaño, el ancho y peso, y el número de granos por espiga, respectivamente. Siguiendo una estrategia de múltiples genes blancos, los autores obtuvieron combinaciones de mutantes para los tres genes, en tres cultivares élites de arroz, logrando aumentos de rendimiento de hasta un 68% en el caso de las líneas editadas simultáneamente en los tres blancos<sup>38</sup>.

### *Mejoramiento de calidad nutricional y/o industrial*

La papa es el tercer cultivo más importante para el consumo humano y posee un rol fundamental en la seguridad alimentaria. Uno de los factores que afectan la calidad y su industrialización es el pardeamiento enzimático, iniciado cuando los tubérculos sufren daño mecánico durante los procesos de cosecha, transporte y almacenamiento. Mediante la edición del gen *StPPO2* (que codifica para una polifenol oxidasa responsable del pardeamiento enzimático en tubérculos) con el sistema CRISPR/Cas9, nuestro grupo<sup>39</sup> ha reportado recientemente la generación de una variedad de papa con reducción de hasta un 73% en el pardeamiento enzimático, lo que representa un beneficio tanto para la industria y los productores (disminución del desperdicio de productos), como para los consumidores (mejores cualidades organolépticas)<sup>39</sup>. Por otro lado, la modificación del almidón de la papa, mediante la obtención de variedades con aumento del contenido de amilosa e incremento del largo de las cadenas de amilopectina, puede contribuir a su calidad nutricional, disminuyendo el índice glucémico post-consumo y los niveles de colesterol en sangre. Con el sistema CRISPR/Cas9 se obtuvieron variedades con estas propiedades mediante la edición de los genes *SBE1* y *SBE2* (que codifican para las enzimas involucradas en la síntesis de amilopectina), de forma individual o simultánea<sup>40,41</sup>. El almidón resultante conformado por cadenas largas de amilopectina, posee además propiedades beneficiosas para su utilización como materia prima en la producción de bioplásticos, los cuales en un futuro podrían reemplazar a algunos de los plásticos basados en materiales de origen fósil que utilizamos hoy en día<sup>41</sup>.

El trigo es uno de los principales componentes de la dieta humana y el cereal más cultivado mundialmente, y una de las primeras especies en ser editadas mediante el sistema CRISPR/Cas9<sup>23</sup>. El consumo de las proteínas del gluten del trigo está asociado a la enfermedad autoinmune celiaquía, en los individuos susceptibles genéticamente. Dentro de las proteínas que conforman el gluten, la familia de las  $\alpha$ -gliadinas son particularmente estimulantes de esta enfermedad. Utilizando el sistema CRISPR/Cas9, Sánchez-León *et al.* (2018) lograron editar regiones conservadas de los genes de la familia

de  $\alpha$ -gliadinas en variedades de trigo pan y trigo duro (candéal), obteniendo líneas editadas en hasta 35 genes en simultáneo, lo que llevó a una considerable reducción de las proteínas  $\alpha$ -gliadinas (32-82%) y una reducción de la inmunoreactividad de hasta un 85%<sup>42</sup>.

#### Resistencia a estreses bióticos y abióticos

La obtención de cultivos con rendimientos elevados y estables en condiciones desfavorables, como el estrés hídrico o las altas temperaturas, es de especial interés en el mejoramiento considerando los efectos adversos del cambio climático. En la respuesta a estrés hídrico, la hormona vegetal etileno juega un rol fundamental. En maíz el gen *ARGOS8* es un regulador negativo de la respuesta a etileno, ya que puede interactuar físicamente con su receptor en la célula, modulando la percepción de la hormona por parte de la misma y por tanto la cascada de señales que llevan a la respuesta. Con el objetivo de aumentar la tolerancia a estrés hídrico maíz, Shi *et al.* (2017) aumentaron la expresión del gen *ARGOS8* en líneas puras, a partir de la edición de la región promotora del gen endógeno mediante el sistema CRISPR/Cas9. Utilizando una secuencia de ADN donante conteniendo el promotor del gen *GOS2* (gen con expresión ubicua y moderada en maíz) y su región 5' no-codificante, los autores lograron obtener líneas editadas con reemplazo del promotor del gen *ARGOS8* por la región promotora del *GOS2*, o bien líneas editadas con inserción de la secuencia promotora del gen *GOS2* río arriba de la secuencia codificante de *ARGOS8*<sup>43</sup>. En ambos casos, las modificaciones resultaron en una sobreexpresión del gen *ARGOS8* en todos los tejidos de las plantas obtenidas, lo que determinó un aumento significativo del rendimiento de las plantas sometidas a déficit hídrico, sin penalidad de rendimiento en condiciones hídricas óptimas para el cultivo<sup>43</sup>.

El uso de variedades de cultivos resistentes a enfermedades, puede asegurar rendimientos altos en condiciones de estrés biótico a la vez que conlleva a una disminución en el uso de químicos para el control de los patógenos que las ocasionan. En papa, el tizón tardío representa la enfermedad más importante para el cultivo a nivel mundial y es causada por el oomycete *Phytophthora infestans*, cuyo control depende del uso de fungicidas aplicados durante el crecimiento de la planta y, en especial, durante el desarrollo de los tubérculos. El uso de variedades de papa resistentes a la enfermedad, representa una alternativa ambientalmente sostenible. En la colonización por parte del patógeno, los llamados genes de susceptibilidad de la planta (genes *S*) tienen un rol fundamental en el avance de la infección. Utilizando el sistema CRISPR/Cas9, Kieu *et al.* (2021) editaron 7 genes *S* candidatos para obtener resistencia al tizón tardío. Los autores lograron obtener plantas editadas en los cuatro alelos de cada gen candidato, de las cuales aquellas editadas en los genes *StDND1*, *StCHL1* y *StDMR6-1* mostraron un incremento de la resistencia a la enfermedad, evidenciada en una menor superficie de las lesiones sufridas en las hojas de las plantas expuestas al oomycete. Adicionalmente, las plantas editadas en el gen *StDMR6-1* mostraron una re-

ducción del número total de hojas afectadas, y en ninguno de los tres casos se observaron efectos adversos en el crecimiento y morfología de las plantas obtenidas<sup>44</sup>.

#### Nuevas tecnologías y perspectivas a futuro en agricultura

El sistema CRISPR/Cas9 ha probado poseer un gran potencial para el mejoramiento de los cultivos. A su vez, se han desarrollado nuevas tecnologías a partir de este sistema que permiten la introducción de otras modificaciones genómicas más allá de las generadas a través de los mecanismos de NHEJ y HR. Muchas características importantes en los cultivos están determinadas por mutaciones puntuales o por reemplazos de una única base dentro de un gen. La técnica de *base-editing* ha surgido como una aproximación novedosa, a partir de la fusión de una nucleasa Cas9 con uno o ambos de sus dominios catalíticamente inactivos (nCas9 o dCas9, respectivamente), fusionada a un dominio con actividad desaminasa. Dependiendo de la naturaleza de este último, el sistema es capaz de catalizar la conversión de una citosina a una timina (C-T) o de una adenina a una guanina (A-G) dentro de una secuencia genómica de forma sitio-dirigida<sup>45</sup>. Más recientemente, la herramienta de *prime-editing* fue desarrollada a partir de la fusión de una nCas9 con una transcriptasa reversa, acoplada a un sgRNA modificado (pegRNA, del inglés *prime editing guide RNA*) que contiene tanto la secuencia necesaria para el reconocimiento del sitio blanco como una secuencia molde de ARN. Dicha secuencia es retrotranscripta a ADN por la transcriptasa reversa, para ser insertada dentro del sitio de reconocimiento y lograr la introducción de nueva información genética<sup>46</sup>. A su vez, los estudios genómicos de nuevas especies de bacterias y arqueas han permitido identificar otras nucleasas que presentan requerimientos diferentes en cuanto a las secuencias PAM, los que aumenta el número de secuencias blanco que pueden editarse dentro de un genoma<sup>47</sup>.

Uno de los principales desafíos en el uso de estas tecnologías en muchas especies de cultivos, lo constituye la introducción en la célula vegetal de los componentes que median la edición genética<sup>48</sup>. Normalmente este paso involucra el uso de moléculas de ADN que codifican para la maquinaria de edición, las cuales son introducidas mediante metodologías como la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* o la utilización de cañones génicos para el bombardeo de partículas<sup>49</sup>. Alternativamente, el uso de protoplastos obtenidos a partir de la degradación de la pared celular vegetal, representa una aproximación ventajosa para la introducción de los componentes en forma de moléculas de ADN o en la forma de complejos ribonucleoproteicos (RNP) ensamblados *in vitro*, lo que evita la integración de ADN foráneo en el genoma de la planta<sup>50-52</sup>. Todas estas aproximaciones dependen de la capacidad de regeneración de distintos explantes o células individuales, lo que involucra procedimientos de cultivo de tejidos cuyo éxito depende en gran medida de la especie y el genotipo en particular<sup>53</sup>. Por lo tanto será crítico en el futuro contar con estrategias de introducción de los componentes de

los sistemas CRISPR, que sean aplicables a variedades élite de cultivos. Algunas aproximaciones tales como la expresión transitoria de reguladores del desarrollo para inducir la transformación de genotipos recalcitrantes, o la introducción de los componentes en tejidos meristemáticos, polen o inflorescencias, representan oportunidades para establecer procedimientos robustos que contribuyan a la aplicación de estas tecnologías a un número mayor de genotipos<sup>33</sup>.

La llegada de esta extensa caja de herramientas a la producción agrícola y al consumo, dependerá en última instancia de los marcos regulatorios que los países establezcan para los organismos resultantes<sup>1,54,55</sup>. Actualmente, existe una discusión global acerca de la aproximación regulatoria que debe utilizarse para los cultivos obtenidos por estas técnicas. La pregunta central abordada en esta discusión es si los productos generados mediante edición génica deben ser sujetos o no a los mismos marcos regulatorios de bioseguridad ya existentes para los Organismos Genéticamente Modificados (OGMs)<sup>56</sup>. Dichos marcos se basan en los principios fundamentales de seguridad de alimentación (tanto humana como animal) y en evaluaciones de riesgo ambiental de los cultivos obtenidos mediante biotecnología<sup>57</sup>, pudiendo distinguirse aquellos basados en el proceso, que se enfocan en las técnicas utilizadas para la obtención del nuevo cultivo, y aquellos basados en el producto, que centran el análisis de las características finales que posee el nuevo cultivo y si éstas representan un riesgo o no<sup>1</sup>. Debido a que CRISPR/Cas9 y otras tecnologías relacionadas pueden utilizarse para la generación de productos que no difieren de aquellos obtenidos por métodos de mejoramiento convencionales o que aparecen espontáneamente en la naturaleza, aquellos países que orientan su regulación al producto final han establecido que los mismos no sean alcanzados por el marco regulatorio de los OGMs<sup>58</sup>. Entre ellos, se destacan los casos de Estados Unidos, Argentina, Brasil y Canadá<sup>59,60</sup>. Por el contrario, la Unión Europea, que posee una regulación basada en el proceso, ha propuesto que los organismos obtenidos mediante esta tecnología sean clasificados como OGM, en una decisión de la Corte Europea de Justicia emitida en julio de 2018<sup>61</sup>. La incertidumbre respecto de la regulación y las diferencias entre las posturas adoptadas por cada país pueden representar un impedimento en la aplicación de esta tecnología para el mejoramiento de cultivos cuyo destino sea la exportación. Sin embargo, la potencialidad de la edición génica en el desarrollo de cultivos con mayor valor nutricional e industrial y su posible impacto positivo en la sostenibilidad productiva y ambiental en un marco de cambio climático global hace necesario rever los marcos regulatorios que la restringen.

## Referencias

- 1 D Zhang, A Hussain, H Manghwar, K Xie, S Xie, S Zhao *et al.* Genome editing with the CRISPR-Cas system: an art, ethics and global regulatory perspective. **Plant Biotechnol. J.**, **18**, 1651-1669 (2020).
- 2 H Puchta. The repair of double-strand breaks in plants: Mechanisms and consequences for genome evolution. **J. Exp. Bot.**, **56**, 1-14 (2005).
- 3 C Schmidt, M Pacher, H Puchta. DNA Break Repair in Plants and Its Application for Genome Engineering. En: *Transgenic Plants: Methods and Protocols*. Kumar S, Barone P, Smith M (Eds.). Springer New York: New York, NY, pp 237-266 (2019).
- 4 TK Huang, H Puchta. CRISPR/Cas-mediated gene targeting in plants: finally a turn for the better for homologous recombination. **Plant Cell Rep.**, **38**, 443-453 (2019).
- 5 S Arnould, C Delenda, S Grizot, C Desseaux, F Pâques, GH Silva *et al.* The I-CreI meganuclease and its engineered derivatives: applications from cell modification to gene therapy. **Protein Eng. Des. Sel.**, **24**, 27-31 (2011).
- 6 D Carroll. Genome Editing: Past, Present, and Future. **Yale J. Biol. Med.**, **90**, 653-659 (2017).
- 7 JA Doudna, E Charpentier. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, **346** (6213), Article Number 1258096, 9 pages (2014).
- 8 F Jiang, JA Doudna. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. **Ann. Rev. Biophys.**, **46**, 505-529 (2017).
- 9 M Jinek, K Chylinski, I Fonfara, M Hauer, JA Doudna, E Charpentier. A Programmable Dual-RNA – Guided. **Science**, **337**, 816-822 (2012).
- 10 Y Ishino, H Shinagawa, K Makino, M Amemura, A Nakata. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. **J. Bacteriol.**, **169**, 5429-5433 (1987).
- 11 FJM Mojica, G Juez, F Rodriguez-Valera. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. **Mol. Microbiol.**, **9**, 613-621 (1993).
- 12 M Morange. What history tells us XXXVII. CRISPR-Cas: The discovery of an immune system in prokaryotes. **J. Biosci.**, **40**, 221-223 (2015).
- 13 R Jansen, JDA van Embden, W Gaastra, LM Schouls. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. **Mol. Microbiol.**, **43**, 1565-1575 (2002).
- 14 KS Makarova, L Aravind, NV Grishin, IB Rogozin, EV Koonin. A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. **Nucleic Acids Res.**, **30**, 482-496 (2002).
- 15 FJM Mojica, C Díez-Villaseñor, J García-Martínez, E Soria. Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. **J. Mol. Evol.**, **60**, 174-182 (2005).
- 16 C Poursel, G Salvignol, G Vergnaud. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. **Microbiology**, **151**, 653-663 (2005).
- 17 A Bolotin, B Quinquis, A Sorokin, SD Ehrlich. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. **Microbiology**, **151**, 2551-2561 (2005).
- 18 R Barrangou, C Fremaux, H Deveau, M Richards, P Boyaval, S



- Moineau *et al.* CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. **Science**, **315**, 1709-1712 (2007).
- 19 SJJ Brouns, MM Jore, M Lundgren, ER Westra, RJH Slijkhuis, APL Snijders *et al.* Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes. **Science**, **321**, 960-964 (2008).
- 20 R Sapranauskas, G Gasiunas, C Fremaux, R Barrangou, P Horvath, V Siksnys. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Res.**, **39**, 9275-9282 (2011).
- 21 E Deltcheva, K Chylinski, CM Sharma, K Gonzales, Y Chao, ZA Pirzada *et al.* CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. **Nature**, **471**, 602-607 (2011).
- 22 L Cong, FA Ran, D Cox, S Lin, R Barretto, N Habib *et al.* Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. **Science**, **339**, 819-823 (2013).
- 23 Q Shan, Y Wang, J Li, Y Zhang, K Chen, Z Liang *et al.* Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. **Nat. Biotechnol.**, **31**, 686-688 (2013).
- 24 JF Li, JE Norville, J Aach, M McCormack, D Zhang, J Bush *et al.* Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. **Nat. Biotechnol.**, **31**, 688-691 (2013).
- 25 V Nekrasov, B Staskawicz, D Weigel, JDG Jones, S Kamoun. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. **Nat. Biotechnol.**, **31**, 691-693 (2013).
- 26 S Shmakov, A Smargon, D Scott, D Cox, N Pyzocha, W Yan *et al.* Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. **Nat. Rev. Microbiol.**, **15**, 169-182 (2017).
- 27 K Belhaj, A Chaparro-Garcia, S Kamoun, V Nekrasov. Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. **Plant Methods**, **9**, 39 (2013).
- 28 L Arora, A Narula. Gene Editing and Crop Improvement Using CRISPR-Cas9 System. **Front. Plant Sci.**, **8**, 1932 (2017).
- 29 K Chen, Y Wang, R Zhang, H Zhang, C Gao. CRISPR/Cas Genome Editing and Precision Plant Breeding in Agriculture. **Ann. Rev. Plant Biol.**, **70**, 667-697 (2019).
- 30 SS Nadakuduti, CR Buell, DF Voytas, CG Starker, DS Douches. Genome Editing for Crop Improvement – Applications in Clonally Propagated Polyploids With a Focus on Potato (*Solanum tuberosum* L.). **Front. Plant Sci.**, **9**, 1-11 (2018).
- 31 CL Soyars, BA Peterson, CA Burr, ZL Nimchuk. Cutting edge genetics: Crispr/cas9 editing of plant genomes. **Plant Cell Physiol.**, **59**, 1608-1620 (2018).
- 32 F Wolter, P Schindele, H Puchta. Plant breeding at the speed of light: the power of CRISPR/Cas to generate directed genetic diversity at multiple sites. **BMC Plant Biol.**, **19**, 176 (2019).
- 33 Y Zhang, M Pribil, M Palmgren, C Gao. A CRISPR way for accelerating improvement of food crops. **Nat. Food**, **1**, 200-205 (2020).
- 34 H Zhu, C Li, C Gao. Applications of CRISPR-Cas in agriculture and plant biotechnology. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, **21**, 661-677 (2020).
- 35 LT Hickey, A N. Hafeez, H Robinson, SA Jackson, SCM Leal-Bertioli, M Tester *et al.* Breeding crops to feed 10 billion. **Nat. Biotechnol.**, **37**, 744-754 (2019).
- 36 D Rodríguez-Leal, ZH Lemmon, J Man, ME Bartlett, ZB Lippman. Engineering Quantitative Trait Variation for Crop Improvement by Genome Editing. **Cell**, **171**, 470-480 (2017).
- 37 R Mishra, RK Joshi, K Zhao. Genome Editing in Rice: Recent Advances, Challenges, and Future Implications. **Front. Plant Sci.**, **9**, 1361 (2018).
- 38 J Zhou, X Xin, Y He, H Chen, Q Li, X Tang *et al.* Multiplex QTL editing of grain-related genes improves yield in elite rice varieties. **Plant Cell Rep.**, **38**, 475-485 (2019).
- 39 MN González, GA Massa, M Andersson, H Turesson, N Olsson, AS Fält *et al.* Reduced Enzymatic Browning in Potato Tubers by Specific Editing of a Polyphenol Oxidase Gene via Ribonucleo-protein Complexes Delivery of the CRISPR/Cas9 System. **Front. Plant Sci.**, **10**, 1-12 (2020).
- 40 A Tuncel, KR Corbin, J Ahn-Jarvis, S Harris, E Hawkins, MA Smedley *et al.* Cas9-mediated mutagenesis of potato starch-branching enzymes generates a range of tuber starch phenotypes. **Plant Biotechnol. J.**, **17**, 2259-2271 (2019).
- 41 X Zhao, S Jayarathna, H Turesson, AS Fält, G Nestor, MN González *et al.* Amylose starch with no detectable branching developed through DNA-free CRISPR-Cas9 mediated mutagenesis of two starch branching enzymes in potato. **Sci. Rep.**, **11**, 4311 (2021).
- 42 S Sánchez-León, J Gil-Humanes, CV Ozuna, MJ Giménez, C Sousa, DF Voytas *et al.* Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. **Plant Biotechnol. J.**, **16**, 902-910 (2018).
- 43 J Shi, H Gao, H Wang, HR Lafitte, RL Archibald, M Yang *et al.* ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. **Plant Biotechnol. J.**, **15**, 207-216 (2017).
- 44 NP Kieu, M Lenman, ES Wang, BL Petersen, E Andreasson. Mutations introduced in susceptibility genes through CRISPR/Cas9 genome editing confer increased late blight resistance in potatoes. **Sci. Rep.**, **11**, 4487 (2021).
- 45 R Mishra, RK Joshi, Z Zhao. Base editing in crops: current advances, limitations and future implications. **Plant Biotechnol. J.**, **18**, 20-31 (2020).
- 46 TK Huang, H Puchta. Novel CRISPR/Cas applications in plants: from prime editing to chromosome engineering. **Transgenic Res.** (2021). doi:10.1007/s11248-021-00238-x.
- 47 DS Aliaga Goltsman, LM Alexander, AE Devoto, JB Albers, J Liu, CN Butterfield *et al.* Novel Type V-A CRISPR Effectors Are Active Nucleases with Expanded Targeting Capabilities. **Cris. J.**, **3**, 454-461 (2020).
- 48 MN González, GA Massa, M Andersson, CA Décima Oneto, H Turesson, L Storani *et al.* Comparative potato genome editing: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and protoplasts transfection delivery of CRISPR/Cas9 components

- directed to StPPO2 gene. **Plant Cell, Tissue Organ. Cult.** (2021). doi:10.1007/s11240-020-02008-9.
- 49 Y Ran, Z Liang, C Gao. Current and future editing reagent delivery systems for plant genome editing. **Sci. China Life Sci.**, **60**, 490-505 (2017).
- 50 JW Woo, J Kim, S Il Kwon, C Corvalán, SW Cho, H Kim *et al.* DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. **Nat. Biotechnol.**, **33**: 1162-1164 (2015).
- 51 M Andersson, H Turesson, N Olsson, AS Fält, P Ohlsson, MN Gonzalez *et al.* Genome editing in potato via CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein delivery. **Physiol. Plant**, **164**, 378-384 (2018).
- 52 CS Lin, CT Hsu, LH Yang, LY Lee, JY Fu, QW Cheng *et al.* Application of protoplast technology to CRISPR/Cas9 mutagenesis: from single-cell mutation detection to mutant plant regeneration. **Plant Biotechnol. J.**, **16**, 1295-1310 (2018).
- 53 SS Nadakuduti, F Enciso-Rodríguez. Advances in Genome Editing With CRISPR Systems and Transformation Technologies for Plant DNA Manipulation. **Front. Plant Sci.**, **11**, 2267 (2021).
- 54 Eckerstorfer MF, Engelhard M, Heissenberger A, Simon S, Teichmann H. Plants Developed by New Genetic Modification Techniques—Comparison of Existing Regulatory Frameworks in the EU and Non-EU Countries. **Front. Bioeng. Biotechnol.**, **7**, 26 (2019).
- 55 R Lassoued, DM Macall, SJ Smyth, PWB Phillips, H Hessel. How should we regulate products of new breeding techniques? Opinion of surveyed experts in plant biotechnology. **Biotechnol. Reports**, **26**, e00460 (2020).
- 56 T Ishii, M Araki. A future scenario of the global regulatory landscape regarding genome-edited crops. **GM Crops Food**, **8**, 44-56 (2017).
- 57 HD Jones. Challenging regulations: Managing risks in crop biotechnology. **Food Energy Secur.**, **4**, 87-91 (2015).
- 58 SE Feingold, V Bonnacarrère, A Nepomuceno, P Hinrichsen, L Cardozo Tellez, H Molinari *et al.* Edición génica: una oportunidad para la región. **Rev. Investig. Agrop.**, **44**, 424-427 (2018).
- 59 D Eriksson, D Kershen, A Nepomuceno, BJ Pogson, H Prieto, K Purnhagen *et al.* A comparison of the EU regulatory approach to directed mutagenesis with that of other jurisdictions, consequences for international trade and potential steps forward. **New Phytol.**, **222**, 1673-1684 (2019).
- 60 MA Lema. Regulatory aspects of gene editing in Argentina. **Transgenic Res.**, **28**, 147-150 (2019).
- 61 <https://curia.europa.eu/jcms/upload/docs/application/pdf/2018-07/cp180111en.pdf>