



COECYTJAL
Consejo Estatal de Ciencia
y Tecnología de Jalisco

TÓPICOS DE HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA

Topics of Biotechnological Tools for Agricultural Development



Tópicos de Herramientas Biotecnológicas para el Desarrollo Agrícola

Topics of Biotechnological Tools for Agricultural Development

EDITOR

José Juvencio Castañeda Nava

AUTORES

Janet María León Morales

Soledad García-Morales

Antonia Gutiérrez Mora

José Juvencio Castañeda-Nava

Prasad Rout Nutan

José Manuel Rodríguez Domínguez

Julio A. Massange Sánchez

Rodrigo Barba González

Jhony Navat Enriquez Vara

Gabriel Rincón Enríquez



AGRADECIMIENTOS

El libro “Tópicos de Herramientas Biotecnológicas para el Desarrollo Agrícola” fue apoyado por el programa 2020 Programa de Difusión y Divulgación de la Ciencia, Tecnología e Innovación (DyD) del Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología de Jalisco (COECYTJAL).

Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Laboratorio Nacional PlanTECC por el apoyo económico otorgado en el proyecto “Mantenimiento de la infraestructura del Laboratorio Nacional PlanTECC” con número 315918 en el año 2021.

“Tópicos de Herramientas Biotecnológicas para el Desarrollo Agrícola”

© Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C.

Av. Normalistas # 800

Col. Colinas de la Normal

C.P. 44270

Guadalajara, Jalisco, México.

www.ciatej.mx

Año de edición 2021

Primera edición impresa 2021

Número Internacional Normalizado del Libro impreso (ISBN): 978-607-8734-32-0

Número Internacional Normalizado del Libro digital (ISBN): 978-607-8734-35-1

Fotografía de la Portada: José Juvencio Castañeda-Nava

Diseño de portada: Karen Elizabeth Pérez Beltrán

Capítulo VII

Técnicas Avanzadas de Biología Molecular y su Aplicación en los Cultivos

Advanced Molecular Biology Techniques and their Application in Crops

Julio A. Massange-Sánchez^{1*}

¹Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Camino Arenero 1227, El Bajío, Zapopan, Jalisco, México, CP 45019. *Autor de correspondencia: jmassange@ciatej.mx

Introducción

La calidad y producción agrícola sostenible es un tema importante debido al aumento de la población mundial (9.7 billones de personas en el 2050) y el calentamiento global. Esto implica que es necesario incrementar la producción agrícola para alimentar a toda la población en las siguientes décadas, ya sea por la expansión de tierras arables, o por el incremento en el rendimiento de la producción. Además, de generar plantas más resistentes a condiciones ambientales adversas, particularmente, cuando varios tipos de estrés ocurren en combinación, teniendo un efecto devastador sobre el crecimiento y productividad de las plantas [1]. Las herramientas biotecnológicas han sido empleadas para generar cultivos con estas características, ya que proveen precisión, fiabilidad y reducen el ciclo de mejoramiento en cultivos de larga duración.

El mejoramiento de variedades de plantas o fitomejoramiento, ha sido utilizado por los humanos desde hace 10,000 años, seleccionando de manera visible los fenotipos que facilitaban la cosecha y el incremento de la producción, dando lugar a la domesticación de las primeras variedades de cultivos Figura 1 [2]. En el siglo XIX, avances en los principios de hibridación y selección descritos por Darwin y la asociación entre fenotipo y genotipo hechas por Mendel establecieron las bases del fitomejoramiento tradicional Figura 1 [3]. Posteriormente, avances en el entendimiento de la biología vegetal, inducción de la variación genética, citogénesis, genética cuantitativa, biología molecular, genética, biotecnología y las ciencias “ómicas” han sido exitosamente aplicadas para el fitomejoramiento de especies de interés comercial Figura 1 [4]. Recientemente, los avances en la edición de genomas en regiones específicas proporcionan la capacidad de modificar con precisión características deseables en los cultivos [5].

El objetivo de este manual es describir las técnicas más avanzadas de la biología molecular que son implementadas en el fitomejoramiento de cultivos. En este contexto, se puede identificar cuatro épocas principales del fitomejoramiento 1) el fitomejoramiento basado en la selección de variantes observadas, sin conocer su origen 2)

Introduction

Sustainable agricultural and quality production is an important topic because of world growth population (9.7 billion people by 2050) and global warming. These factors imply the need of increasing agriculture production to feed the whole population in the next decades, either by arable land expansion or increasing yield production. Additionally, resistant plants to adverse environmental conditions should be cultivated, particularly when several types of stress occur in combination with a devastating effect on plant growth and productivity [1]. Biotechnological tools have been used to generate cultivars with those traits, since they provide precision, feasibility and reduce the improvement cycle of long-term cultivation.

Plant variety improvement or plant breeding was used by humans 10 000 years ago, selecting visual phenotypes that made harvesting easier, increasing production and giving rise to the domestication of the first crop varieties (Figure 1) [2]. In the 19th century, advances in hybridation and selection principles described by Darwin and the association between phenotype and genotype made by Mendel, established the bases of traditional plant breeding (Figure 1) [3]. Subsequently, advances in knowledge of plant biology, induction of genetic variation, cytogenesis, quantitative genetics, molecular biology, genetics, biotechnology and omic sciences have been successfully applied for species plant breeding of commercial interest (Figure 1) [4]. Recently, advances in genome edition in specific regions provide the capacity to modify desirable characteristics in crops with edition precision [5].

Therefore, the objective of this handbook is to describe the most advanced techniques of molecular biology, which are implemented in crop plant breeding. In this context, four main stages can be identified. Plant breeding is based on (1) selection of varieties observed without knowing their origin; (2) generation and selection of genetic variation by controlled breeding; (3) genetic variation and selection of specific

fitomejoramiento basado en la generación y selección de la variación genética mediante el cruzamiento controlado 3) fitomejoramiento basado en el monitoreo de la variación genética y selección de recombinantes específicas 4) el fitomejoramiento basado en la creación e introducción de variación genómica novedosa en los genomas a través de la ingeniería genética.

recombinants; (4) creation and introduction of novel genomic variation through genetic engineering.

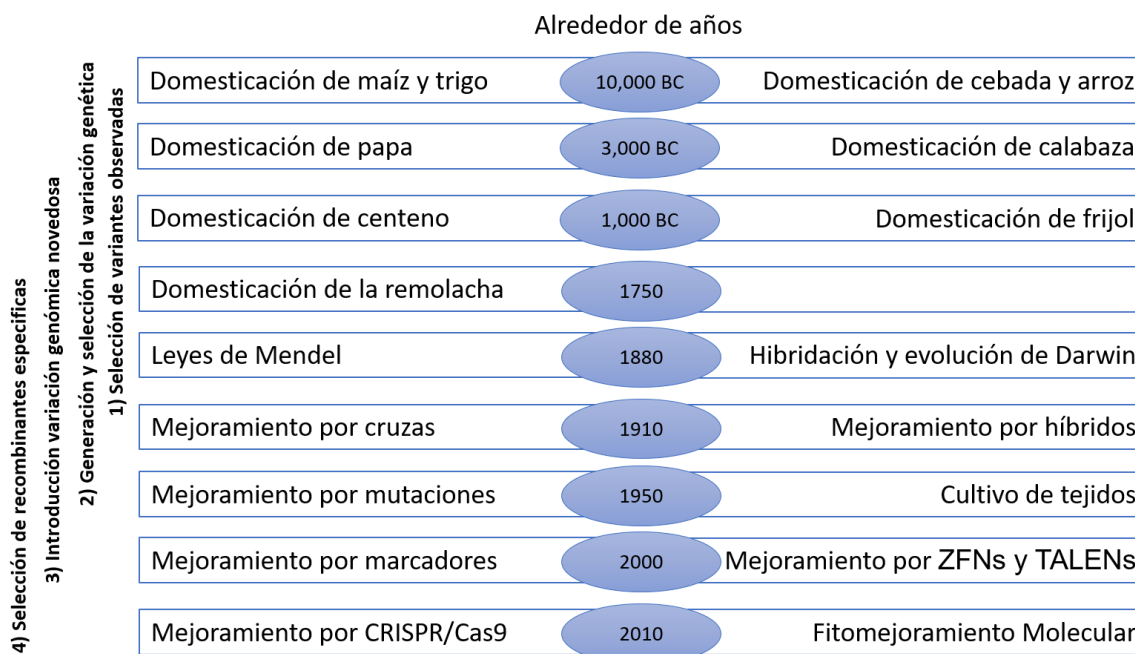


Figura 1. Línea del tiempo de los hallazgos más relevantes en fitomejoramiento.

Figure 1 Time line of the most relevant plant breeding findings.

Fitomejoramiento basado en la selección de variantes observadas

Plant breeding based on selection of observed variations

La forma más primitiva del fitomejoramiento fue la selección de variantes naturales en la naturaleza, que más tarde se llevó al campo. La mayoría de los cultivos fueron domesticados hace ≈10,000 años, en la cual se incluye los cereales más productivos de la actualidad: maíz, trigo, cebada y arroz [6,7]. La variación genética fue constantemente sometida a la presión de selección de ciclos siembra/cosecha y recolección de alimentos. En algunos casos, este proceso dio como resultado en grandes cambios en el fenotipo de la planta, por ejemplo, la derivación del maíz a partir del teosinte o el arroz (*Oryza sativa*) a partir de *Oryza rufipogon* [8].

The most primitive form of plant breeding was natural selection variation, which was later taken to the field. The majority of the crops were domesticated ~10 000 years ago, of which the most productive cereals are included: corn, wheat, barley, and rice [6,7]. The generic variation was constantly subjected to selection pressure of sowing/harvesting cycles and food recollection. In some cases, this process resulted in great changes in plant phenotype. For example, maize derived starting from teosinte or rice (*Oryza sativa*) from *Oryza rufipogon* [8].

Otro ejemplo, basado en la selección de variantes observadas es el origen de las razas. Las razas son poblaciones de plantas que han sido cultivadas por muchas generaciones en una cierta región, que tiene condiciones particulares; cierto tipo de estrés biótico y abiótico, manejo

Another example based on selection of the variants observed is the origin of race. Races are plant populations that have been cultivated by many generations in a certain region that has particular conditions: a certain type of biotic or abiotic stress, crop and seed management and food preferences.

de cultivo, manejo de semilla y preferencias alimenticias. Estas son entidades genéticamente diversas; continuamente cambiando como consecuencia de selección intencional y no intencional por la mezcla de semilla y el intercambio de polen. Las razas son una mezcla entre una "selección estabilizada" y una "selección direccionada" que pretende mantener la identidad de una raza en una localidad con ajustes pequeños para la adaptación a cambios ambientales. En la actualidad las razas pueden dar origen a cultivos modernos [9].

El primer método de fitomejoramiento basado en un conocimiento básico de las leyes de la herencia fue la selección de plantas dentro de las razas. Este se basó en el supuesto de que las progenies de los mejores individuos sean superiores a la progenie de individuos aleatorios dentro de una población. Este hecho puede ser considerado como el origen del paradigma de la homogeneidad que domina el fitomejoramiento hasta el día de hoy. En el caso de especies autopolinizantes, como arroz y trigo, las razas locales pueden ser una mezcla de líneas puras, incluyendo algunos individuos heterocigotos derivados de una baja frecuencia de polinización cruzada. En este tipo de población, la selección de plantas individuales y la deriva de estas progenies da como resultado que algunas líneas superen el crecimiento/rendimiento de razas locales en una región específica [9].

Fitomejoramiento basado en la generación y selección de la variación genética

A pesar de la gran diversidad genética que se puede encontrar en las razas, la sencilla aplicación de la selección en la diversidad preexistente eventualmente llega al límite. Dada el gran número de posibilidades que resultan de la cruce de diversos padres, el paso limitante para la ganancia genética empieza con la capacidad del programa de fitomejoramiento para evaluar un largo número de plantas, derivado de un largo número de cruces [10].

La gran mayoría de los cultivares de especies autopolinizadas liberadas hoy en día, han sido desarrolladas a través del método de pedigrí. El fitomejoramiento por pedigrí consiste en el cruzamiento de padres y la generación de poblaciones segregantes, las cuales se llevan a través de varias generaciones de autopolinización y selección, hasta un grupo de líneas derivadas que combinan y obtienen las buenas características de los padres. Debido a que este método es basado en la complementación de rasgos es muy eficiente para el mejoramiento de características de cualitativas como la resistencia a enfermedades, arquitectura, color y formas de la parte de las plantas. Una desventaja de este método es el hecho que el rendimiento es evaluado eficientemente hasta el final del proceso en líneas derivadas, cuando las semillas están disponibles para ensayos replicados [11].

They are genetically diverse entities, continuously changing as a consequence of intentional or not for seed mixture and pollen exchange. Races are a mixture between a "stabilized selection" and "directional selection" that intends maintaining race identity in a locality with small adjustments to adapt to environmental changes. Currently, races may give origin to modern crops [9].

The first plant breeding method based on basic knowledge of the laws of heredity was plant selection within races, which assumes that progenies of the best individuals are higher in the progeny of aleatory individuals within a population. This fact may be considered as the origin of the homogeneity paradigm that dominates plant breeding up to now. In the case of self-pollinating species, such as rice and wheat, local races may be a mix of pure lines, including some heterozygous individuals that derived from a low crossed pollination frequency. In this type of population, individual plant selection and those derived from these progenies give as a result that some lines go beyond growth/yield of local races in a specific region [9].

Plant breeding based on generation and genetic variation selection

Despite the great genetic diversity that can be found in races, the single selection application in preexisting diversity eventually comes to a limit. Given that a great number of possibilities result from breeding diverse parents, the limiting step for genetic profit starts from the capacity of a plant breeding program to evaluate a large number of plants, deriving from a large number of breeding [10].

The great majority of self-pollinating cultivar species released nowadays have been developed by the pedigree method. Pedigree plant breeding consists of breeding parents and segregating populations, which are held throughout several self-pollinating, and selection techniques up to a derived group of lines that combine and obtain the good characteristics of the parents. Because this method is based on complementary features, it is very efficient for improving qualitative characteristics, such as resistance to diseases, architecture, color and shape of a plant part. A disadvantage of this method is the fact that yield is assessed until the end of the process in derived lines when seeds are available for replicate experiments [11].

In modern plant breeding populations, the objective is to increase the population value as a source of elite lines. Heterosis is the superiority of individual hybrid vigor compared with derived individuals. Within certain limits, if the parents have greater divergence, the

En poblaciones de fitomejoramiento modernas, el objetivo es aumentar el valor de la población como una fuente de líneas elite. Heterosis es la superioridad de híbridos individuales comparados con derivados individuales. Dentro de ciertos límites, si los padres tienen mayor divergencia, el grado de heterosis es mayor en las nuevas generaciones. El vigor híbrido disminuye rápidamente a través de las generaciones que se autopolinizan indicando que cualquiera que sea el mecanismo de la heterosis este disminuye debido a la presencia de *locus* heterocigotos [12].

Fitomejoramiento basado en el monitoreo de la variación genética y selección de recombinantes específicas

Los métodos de fitomejoramiento tradicional fueron basados en la complementariedad entre las características de los parentales. Sin embargo, poco o nada se sabía acerca de la parte del genoma que venía de cada padre. Esta situación cambió con la llegada y disminución de la tecnología de los marcadores moleculares, los cuales hicieron posible el monitoreo de la transmisión de segmentos de cromosomas en la progenie [9].

Los marcadores moleculares son herramientas esenciales para estudiar el control genético de cualquier característica de interés, eventualmente dirigidas a la identificación de genes responsable de la característica, esta área es denominada como Biología Molecular y revolucionó las ciencias biológicas en décadas pasadas [13].

Cuando muchos marcadores moleculares están genotipados en un grupo de plantas derivadas de una sola cruce, la frecuencia de recombinación entre ellos puede ser usado para inferir el orden y la relativa distancia en los cromosomas, resultando en un mapa genético. Si estas plantas o sus progenies son evaluadas para una característica cuantitativa, se puede construir un modelo estadístico en el que la variancia fenotípica puede ser explicada por alguna de los marcadores, lo cual implica que esos marcadores deben estar ligados a los genes responsables de las características. Este enfoque se llama mapas QTL (por sus siglas en inglés, *Quantitative Trait Loci*), que son normalmente el primer paso para entender el control genético de una característica cuantitativa. El resultado final es la identificación del gen y el polimorfismo en la secuencia de nucleótidos responsable por las diferencias fenotípicas observadas [14].

Recientes avances en la tecnología de genotipo ha reducido los costos para genotipar, creando la posibilidad de monitorear miles de marcadores en una población de plantas bajo selección. En este escenario los fitomejoradores tienen una gran cantidad de datos con una relación desconocida de cada marcador con características fenotípicas. La técnica genómica de selección propone que la relación entre marcadores y genes específicos puede ser utilizado para producir un "valor de fitomejoramiento" sin necesidad de evaluar el fenotipo, usando modelos

degree of heterosis is greater in new generations. Hybrid vigor decreases rapidly through self-pollinating generations indicating that whichever heterosis mechanism is, it decreases due to the presence of heterozygous *locus* [12].

Plant breeding based on genetic variation tracking and specific recombinant selection

Traditional plant breeding methods were based on complementarity between parental characteristics. However, very little or nothing was known about the genome part that came from each parent. This situation changed with molecular marker technology, which made monitoring chromosome segment transmission in progeny possible [9].

Molecular markers are essential tools to study the genetic control of any characteristic of interest, eventually directed to identifying the genes responsible for the specific characteristic. This field is called Molecular Biology and has revolutionized biological sciences in past decades [13].

When many molecular markers are genotyped in a group of plants deriving from one breed only, the recombination frequency among them may be used to infer order and relative distance in the chromosomes, resulting in a genetic map. If these plants or their progenies are evaluated for a quantitative characteristic, a statistical model may be constructed, in which the phenotypic variance may be explained by any of the markers. Thus, these markers imply to be linked to the genes responsible for those characteristics. This approach is called *Quantitative Trait Loci* (QTL), which is usually the first step to understand the genetic control of a quantitative characteristic. The final result is gene identification and polymorphism in the nucleotide sequence responsible for the phenotypic differences observed [14].

Recent advances in genotype technology have reduced costs for genotyping, creating the possibility of monitoring thousands of markers in a plant population under selection. In this scenario plant breeders have a great number of data with an unknown relationship of each marker with phenotypical characteristics. The genomic selection technique proposes that the relationship between specific genes and markers may be used to produce a plant breeding value without the need of assessing the phenotype, using statistical models in a training population for which all the genotypes and phenotypes have been recorded [13]. Genomics selection may be used to accelerate plant breeding in crop yield, which is frequently considered as the most difficult characteristic to assist. Currently, large seed

estadísticos en una “población de entrenamiento” para la cual todos los genotipos y fenotipos han sido anotados [13]. La genómica de selección puede ser usada para acelerar el fitomejoramiento en el rendimiento de los cultivos, el cual es frecuentemente considerado como la característica más difícil de asistir. En la actualidad, grandes compañías en producción de semillas están invirtiendo en el análisis de secuenciación masiva y bioinformática para hacer la integración de genómica de selección en programas de fitomejoramiento.

Fitomejoramiento basado en la creación e introducción de variación genómica novedosa en los genomas

*M*as allá de la tecnología de marcadores moleculares, la tecnología de edición de genomas usando la ingeniería de endonucleasas son muy populares hoy en día. En esta se incluyen las tecnologías que usan “Zinc Finger Nucleases” (ZFNs) y la “Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs)”, las cuales son capaces de generar modificaciones genómicas de una manera razonablemente fácil y accesible. La más avanzada tecnología para interrumpir una doble cadena de ADN es la popularmente conocida como el sistema “CRISPR/Cas9”. CRISPR/Cas9 significa “Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/associated protein 9” [5].

La tecnología CRISPR/Cas9 funciona produciendo una guía de RNA (alrededor de 18-20 nucleótidos) que se une a una secuencia blanco de DNA, en donde la enzima Cas9 corta en una posición de 3-4 nucleótidos adyacente al sitio PAM (proto spacer motif 3), posteriormente el sistema se regenera produciendo deleciones e inserciones que producen alteraciones en el gen blanco. Es importante mencionar que existen seis distintos tipos de esta tecnología (I, II, III, IV, V y VI), pero el tipo II es la más ampliamente utilizada [15]. Muchas plantas han sido sometidas a la edición de genomas, algunos ejemplos de mejoramiento de cultivos se muestran en la Tabla 1.

production companies are investing in massive sequence analyses in plant breeding programs.

Plant breeding based on creation and introduction of novel genomic variation

*B*eyond molecular marker technologies, genome editing technology using endonuclease engineering is very popular nowadays, which include technologies that use “Zinc Finger Nucleases” (ZFNs) and “Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs)”, capable of generating genomic modifications in a reasonably easy and accessible way. The most advanced technology to interrupt a double chain DNA is commonly known as “CRISPR/Cas9” system. CRISPR/Cas9 means Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/associated protein 9 [5].

The CRISPR/Cas9 technology functions producing an RNA guide (~18-20 nucleotides) that links to the target DNA sequence, in which the Cas9 enzyme cuts into a position of 3-4 nucleotides adjacent to the PAM (proto spacer motif 3) site. Subsequently, the system regenerates producing deletions and insertions that produce alterations in the target gene. It is important to mention that six different types of this technology exist (I, II, III, IV, V y VI), but Type II is the most widely used [15]. Many plants have been subjected to genome edition. Some examples of crop improvement are shown in Table 1.

Tabla 1. Ejemplos de cultivos que han sido mejorados mediante la edición de genomas
Table 1. Examples of crops that have been improved by genome edition

Cultivo	Tecnología	Genes	Característica mejorada	Referencia
Maíz	ZFNs	ZmIPK1	Tolerante a herbicida	16
Arroz	TALENs	OsSWEET14	Resistencia al Tizón bacteriano	17
Trigo	TALENs	TaMLO	Resistencia al moho polvoriento	18
Azúcar de caña	TALENs	COMT	Mejoramiento de la composición de la pared celular	19
Papa	TALENs	VInv	Minimizar la reducción de azúcar	20
Arroz	CRISPR/Cas9	Gnla1, GS3, DEP1	Numero de grano, longitud de grano, panículas densas erectas	21
Tomate	CRISPR/Cas9	SIMLO1	Resistencia al moho polvoriento	22
Naranja	CRISPR/Cas9	Promotor CsLOB1	Resistencia al cancro de los cítricos	23
Calabaza	CRISPR/Cas9	eIF4E	Resistencia a virus	24
Arroz	CRISPR/Cas9	OsMATL	Inducción de haploidía en plantas	25
Maíz	CRISPR/Cas9	ARGOS8	Resistencia a sequia	26
Papa	CRISPR/Cas9	Wx1	Alto contenido de amilopectina	27

Desafortunadamente, el desarrollo de nuevas variedades a través de la edición de genomas ha sido retrasada por ser considerada una técnica que genera organismos genéticamente modificados, incluso aunque esté libre de transgenes.

Unfortunately, the development of new varieties through genome edition has been delayed because it has been considered a technique that generates genetically modified organisms, even those transgene-free.

Referencias References

1. Araus JL, Slafer GA, Royo C, *et al.* Breeding for yield potential and stress adaptation in cereals. *CRC Crit Rev Plant Sci.* 2008;27: 377–412. doi:10.1080/07352680802467736
2. Jain S *Crops Man.* 2nd ed.(1992) By Jack R. Harlan. American Society of Agronomy, 677 S. Segoe Road, Madison, WI 53711. 284 pp. \$34 hardcover. *Am J Altern Agric.* 8: 47–48. doi:10.1017/S0889189300004938
3. Fairbanks DJ, Mendel, Darwin (2020) untangling a persistent enigma. *Heredity (Edinb).;*124: 263–273. doi:10.1038/s41437-019-0289-9
4. Mohan Jain S, Brar DS, (2009) *Molecular techniques in crop improvement: 2nd edition.* Molecular Techniques in Crop Improvement: 2nd Edition. doi:10.1007/978-90-481-2967-6
5. Fichtner F, Urrea Castellanos R, Ülker B. (2014) Precision genetic modifications: A new era in molecular biology and crop improvement. *Planta* 239: 921–939. doi:10.1007/s00425-014-2029-y
6. Meyer RS, Purugganan MD (2013) Evolution of crop species: Genetics of domestication and diversification. *Nat Rev Genet.*14: 840–852. doi:10.1038/nrg3605
7. Feuillet C, Langridge P, Waugh R. (2007) Cereal breeding takes a walk on the wild side. *Trends Genet.* 2008;24: 24–32. doi:10.1016/j.tig. 11.001
8. Chen Q, Li W, Tan L, Tian F (2020) Harnessing Knowledge from Maize and Rice Domestication for New Crop Breeding. *Mol Plant.* 2021;14: 9–26. doi:10.1016/j.molp. 12.006
9. McNally KL, Childs KL, Bohnert R, *et al.* (2009) Genomewide SNP variation reveals relationships among landraces and modern varieties of rice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106: 12273–12278. doi:10.1073/pnas.0900992106

10. Rasmusson DC, Phillips RL. (1997) Plant Breeding Progress and Genetic Diversity from De Novo Variation and Elevated Epistasis. *Crop Sci.* 37: cropsci1997.0011183X003700020001x. doi:<https://doi.org/10.2135/cropsci1997.0011183X003700020001x>
11. Breseghello F, de Moraes OP, Pinheiro PV, *et al.* (2011) Results of 25 Years of Upland Rice Breeding in Brazil. *Crop Sci.* 51: 914–923. doi:<https://doi.org/10.2135/cropsci2010.06.0325>
12. Shull GH. (1948) What Is “Heterosis”? *Genetics.* 33: 439–446.
13. Nadeem MA, Nawaz MA, Shahid MQ, *et al.* (2018) DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 32: 261–285. doi:10.1080/13102818.2017.1400401
14. Price AH. (2006) Believe it or not, QTLs are accurate! *Trends Plant Sci.* 11: 213–216. doi:10.1016/j.tplants.2006.03.006
15. Dheer P, Rautela I, Sharma V, *et al.* (2020) Evolution in crop improvement approaches and future prospects of molecular markers to CRISPR/Cas9 system. *Gene* 753: 144795. doi:10.1016/j.gene.2020.144795
16. Shukla VK, Doyon Y, Miller JC, *et al.* (2009) Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature.* 459: 437–441. doi:10.1038/nature07992
17. Li T, Liu B, Spalding MH, *et al.* (2012) High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nature biotechnology.* United States; pp. 390–392. doi:10.1038/nbt.2199
18. Wang Y, Cheng X, Shan Q, *et al.* (2014) Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol.* 32: 947–951. doi:10.1038/nbt.2969
19. Jung JH, Altpeter F. (2016) TALEN mediated targeted mutagenesis of the caffeic acid O-methyltransferase in highly polyploid sugarcane improves cell wall composition for production of bioethanol. *Plant Mol Biol.* 92: 131–142. doi:10.1007/s11103-016-0499-y
20. Clasen BM, Stoddard TJ, Luo S, *et al.* (2016) Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout. *Plant Biotechnol J.* 14: 169–176. doi:10.1111/pbi.12370
21. Li M, Li X, Zhou Z, *et al.* (2016) Reassessment of the Four Yield-related Genes *Gn1a*, *DEP1*, *GS3*, and *IPA1* in Rice Using a CRISPR/Cas9 System. *Front Plant Sci.* 7: 377. doi:10.3389/fpls.2016.00377
22. Nekrasov V, Wang C, Win J, *et al.* (2017) Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. *Sci Rep.* 7: 482. doi:10.1038/s41598-017-00578-x
23. Peng A, Chen S, Lei T *et al.* (2017) Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene *CsLOB1* promoter in citrus. *Plant Biotechnol J.* 2017;15: 1509–1519. doi:10.1111/pbi.12733
24. Chandrasekaran J, Brumin M, Wolf D, *et al.* (2016) Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Mol Plant Pathol.* 17: 1140–1153. doi:10.1111/mpp.12375
25. Yao L, Zhang Y, Liu C, *et al.* (2018) *OsMATL* mutation induces haploid seed formation in indica rice. *Nat Plants.* 4: 530–533. doi:10.1038/s41477-018-0193-y
26. Shi J, Gao H, Wang H, *et al.* (2017) *ARGOS8* variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnol J.* 15: 207–216. doi:10.1111/pbi.12603
27. Andersson M, Turesson H, Nicolai A, *et al.* (2017) Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. *Plant Cell Rep.* 36: 117–128. doi:10.1007/s00299-016-2062-3