

## **Genome editing: il futuro (prossimo) del miglioramento genetico delle piante**

**Andrea Cavallini, Tommaso Giordani, Lucia Natali\***

*Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali, Università di Pisa*

Ricezione: 22 giugno 2016; Accettazione 20 luglio 2016

### **Genome editing: the (near) future of plant breeding**

**Abstract.** Genome editing, or genome editing with engineered nucleases, is a technology that, using engineered nucleases, allows site-specific single-base mutations or the insertion, deletion or replacement of DNA sequences in a specific site in the genome of an organism. Genome editing is based on the induction of double strand breaks (DSBs) in the DNA in the locus of interest to introduce mutations in that locus. In fact, after DSB induction, the damage will be repaired by processes (the non-homologous end joining and/or the homology-directed repair), that occur naturally in the cells and during which mutations may occur. DSBs can be induced by different nucleases, all capable of specifically recognising a locus in the genome. The most promising is the CRISPR/Cas system, for ease of designing nucleases with sequence specificity and for the fact that it can be used in nearly every organism. In the CRISPR/Cas9 system, the recognition of the DNA sequence to be modified is operated by an RNA sequence. After successful DNA DSB, the cell proceeds with the repair of DNA. Generally, the cell uses non-homologous end joining, which produces substitutions, insertions and deletions of nucleotides in the damaged DNA site, and usually leads to loss of function of the target gene. When using this mode, the genome editing can be considered a biological site-specific mutagenesis, different from the mutagenesis induced by physical or chemical agents which randomly induce mutations through the entire genome. On the contrary, when homology-directed repair is involved, genome editing can be considered a predetermined biological mutagenesis that modifies or corrects the target gene in the sense determined by the investigator. Applying genome editing to plants requires also ancillary technologies, according to the species and cell types. First, *in vitro*

culture techniques, especially protoplast cultures, might be necessary for the production of cells that can be subjected to the nuclease treatment. Then, transformation vectors (*Agrobacterium*, viruses or biolistic methods) are needed to enable the transfer of the components required for genome editing to the plant cell. The vectors may be stable or transient; in the latter case, both the possible cytotoxicity of constitutively expressed nucleases and the production of transgenic plants would be avoided. Concerning the first results obtained using this technology, mutations in target genes of cultivated plants were obtained mostly through non-homologous end joining for traits related to morphology, quality and to the resistance to pathogens and herbicides, in both herbaceous and woody species. Results were also reported exploiting the homology-directed repair. Overall, the genome editing technology proved suitable to introduce precise and predictable gene mutations directly into elite cultivars, reducing the duration of traditional crossing and backcrossing breeding, with the possibility to modify more than one genes per experiment. Although many advances in genome editing technology have been achieved in recent years, some technical problems remain to be solved, including the need for increasing the efficiency of the system, the production of off-target mutations, the influence of chromatin structure on the editing efficiency, the possible side effects on genes lying close to target genes and the efficiency of the technology in polyploid species (where many copies of target genes occur). In conclusion, the CRISPR/Cas system has emerged as the most important tool for the future of genetics because of its simplicity, versatility and efficiency. It will have a major impact on both basic and applied research and will be used to produce cultivars with improved disease resistance, with a higher nutritional value, and able to survive climate changes, more suitable as bioenergy crops, producing useful chemicals and biomolecules.

---

\* lucia.natali@unipi.it

## L'evoluzione del miglioramento genetico

I metodi di miglioramento genetico che hanno portato alla realizzazione delle varietà di piante coltivate come le conosciamo oggi, hanno utilizzato gli stessi processi intervenuti nell'evoluzione: la creazione di variabilità genetica grazie alla comparsa di mutazioni e la selezione delle forme più adatte all'ambiente in cui la specie vive.

Nell'evoluzione, la variabilità genetica si crea grazie alla mutazione spontanea e ai successivi incroci fra individui diversi, e la selezione è quella naturale che favorisce gli alleli e le combinazioni genotipiche più adatte all'ambiente. In natura, entrambi i processi sono generalmente lenti. Il miglioramento genetico utilizza gli stessi processi, però velocizzandoli, mediante la realizzazione di incroci controllati che creano nuove combinazioni genotipiche e grazie all'applicazione di una selezione stringente e sistematica. Questa è la ragione per cui nel breve periodo (in termini evolutivi) che va dall'inizio dell'agricoltura ad oggi (circa 10.000 anni) le piante coltivate hanno assunto caratteristiche estremamente diverse da quelle dei progenitori selvatici, fino a rappresentare vere e proprie specie nuove.

Nell'ultimo secolo, la conoscenza delle leggi genetiche che regolano la trasmissione dei caratteri ha consentito di rendere ancora più efficiente il processo di incrocio e selezione. A questo si è aggiunta, con la scoperta del DNA, la possibilità di basare la selezione direttamente sul materiale genetico piuttosto che sul fenotipo, soggetto a influenze ambientali (la cosiddetta *Marker assisted Selection*, cfr. Ribaut e Hoisington, 1998). La scoperta del DNA e la sua caratterizzazione funzionale hanno inoltre aperto la strada alla manipolazione del DNA stesso per ottenere mutanti più produttivi, più adatti ad ambienti diversi, o utilizzabili per finalità diverse da quelle per cui la specie viene abitualmente coltivata.

Un primo tentativo di velocizzare la creazione di variabilità genetica attraverso la mutazione si è avuto dopo la seconda guerra mondiale, con l'avvento della mutagenesi sperimentale: mutazioni venivano indotte utilizzando radiazioni o sostanze chimiche e successivamente selezionate per costituire nuovi genotipi. Sebbene questa tecnica abbia portato a numerosi e importanti risultati (in Italia citiamo il frumento duro Creso, cfr. Bozzini e Mosconi 1976), l'induzione di mutazioni con questa procedura è un processo casuale, che quindi comporta moltissime analisi per l'isolamento del mutante. Inoltre, il fatto che il mutante sia stato effettivamente ottenuto non è sicuro fino alla fine della procedura.

Recentemente, le tecniche di mutagenesi sono state affiancate da analisi molecolari (il cosiddetto TILLING, *Targeting Induced Local Lesions in Genomes*, cfr. Comai *et al.* 2004), che velocizzano il processo di selezione; tuttavia, restando il processo di mutazione casuale, anche questa metodologia ha evidenti limiti di efficienza.

Negli anni 80 si è cominciato ad applicare alle piante la tecnologia del DNA ricombinante, la cosiddetta "ingegneria genetica" (Hynes, 1989), consistente nella produzione di varietà modificate mediante l'inserzione nel genoma di singoli geni di specie diverse. Questo approccio si è rivelato fino ad oggi grossolano e casuale (non è possibile prevedere il sito di inserimento del gene estraneo nel genoma), ed è stato applicato a relativamente poche varietà, nella direzione di una agricoltura sempre più globalizzata e industriale, poco interessata al mantenimento della biodiversità e del carico ambientale connesso alle tecniche colturali. Una ricerca "pubblica" sull'uso della tecnica per trasferire geni utili al miglioramento della qualità e per l'adattamento all'ambiente avrebbe potuto modificare questa situazione e rendere più accettabili i cosiddetti OGM da parte dell'opinione pubblica.

Recentemente, per superare i problemi di accettazione da parte del pubblico e i potenziali rischi derivati dall'uso di piante transgeniche che esprimono geni estranei alla specie, sono state prodotte piante cisgeniche e intrageniche, mediante il trasferimento di geni e sequenze regolatrici isolate da altri genotipi della stessa specie o di specie sessualmente compatibili, una metodologia che mima quanto può avvenire in natura attraverso l'incrocio e la ricombinazione (Holme *et al.* 2013).

Nel caso della cisgenesi, viene trasferito il gene completo, comprese le sequenze regolatrici, nel giusto orientamento. Nella intragenesi, le sequenze codificanti e/o regolatorie da trasferire sono costruite con orientamento sia senso che antiseno, per esempio nel caso in cui si voglia cercare di ridurre l'espressione del gene originale. Almeno in principio, le piante cisgeniche potrebbero essere ottenute anche attraverso il *breeding* convenzionale, mentre quelle intrageniche possono essere ottenute solo per via biotecnologica. Tuttavia, rispetto ai transgenici convenzionali, i cisgenici e gli intragenici sono caratterizzati dall'uso di sequenze di DNA della stessa specie o di specie vicine. Inoltre, per la trasformazione si cerca di utilizzare procedure che evitino l'uso di geni marcatori selettivi estranei, come i geni di resistenza agli antibiotici (Holme *et al.* 2013).

Negli ultimi dieci-quindici anni, si è assistito ad una vera e propria rivoluzione nell'ambito delle scien-

ze genetico-molecolari, con l'affermazione della genomica, favorita prima di tutto dalla messa a punto di tecnologie innovative di sequenziamento (*high throughput sequencing*) che hanno estremamente velocizzato l'ottenimento della sequenza completa del genoma di numerose specie di interesse agrario come riso, mais, pomodoro, patata, peperone, melanzana, cetriolo, melone, vite, pioppo e altri (Bolger *et al.* 2014, Hamilton e Buell 2012, Michael e VanBuren 2015). Queste tecnologie stanno consentendo il risequenziamento completo o parziale di centinaia di genotipi delle stesse specie nonché la valutazione precisa della diversità allelica in popolazioni di accessioni selvatiche e di specie vicine (Causse *et al.* 2013, Lin *et al.* 2014, Mascher *et al.* 2013, Neves *et al.* 2013, Saintenac *et al.* 2011).

Nelle specie usate in agricoltura, il sequenziamento del genoma consente e consentirà di individuare tutti i geni coinvolti nello sviluppo, nella riproduzione, nell'adattamento all'ambiente, nella risposta alle malattie delle piante e di valutarne i sistemi di regolazione che determinano la variabilità fenotipica come la vediamo. Questo favorirà enormemente l'adozione di pratiche di selezione assistita da marcatori molecolari, *Marker Assisted Selection*, già correntemente applicata da molti anni e che consente una selezione molto più mirata e precisa delle caratteristiche utili.

Le prospettive maggiori per il miglioramento genetico, legate all'uso della genomica, vengono aperte dalla disponibilità di nuove tecniche bio-molecolari che permettono il *genome editing* (De Souza 2012), cioè protocolli sperimentali che consentono, una volta individuato il gene o il frammento di DNA coinvolto in un determinato carattere, di inattivarlo o di modificarlo in modo da modificare lo stesso carattere, in pratica di rendere il processo della mutazione non più casuale, ma specifico, mirato, con l'ovvio vantaggio di velocizzare moltissimo il processo di miglioramento genetico e di rispondere in tempi brevi anche a cambiamenti ambientali drastici e improvvisi.

In considerazione degli scenari futuri dell'agricoltura (in cui si possono prevedere ulteriori incrementi della popolazione mondiale e variazioni anche drastiche degli ambienti agricoli), i metodi di miglioramento genetico basati sul *genome editing*, più rapidi e sicuri di quelli attualmente disponibili, potrebbero essere utilizzati, sia per l'agricoltura convenzionale che per quella biologica.

### **Basi metodologiche del *genome editing***

#### *Induzione di mutazioni sito specifiche*

Il *genome editing* prevede l'applicazione di diverse

tecniche per modificare, cancellare, sostituire o inserire sequenze di DNA di interesse che si trovano in uno specifico sito nel genoma. Per questo è necessario indurre delle rotture in entrambi i filamenti del DNA nel locus di interesse, che saranno poi riparate mediante processi che avvengono naturalmente nelle cellule, durante i quali si possono produrre delle mutazioni.

Infatti, in natura, in caso di lesioni a doppio filamento del DNA, intervengono due meccanismi di riparazione (fig. 1), la giunzione di estremità non omologhe (*non-homologous end-joining*, NHEJ) oppure la riparazione mediante ricombinazione omologa (*homology-directed repair*, HDR) (Gaj *et al.* 2013, Puchta e Fauser 2014, Rinaldo e Ayliffe 2015, Voytas 2013).

Il primo meccanismo, la giunzione delle estremità non omologhe, è il più diffuso negli eucarioti multicellulari, comprese le piante superiori (Schiml e Puchta 2016) ed è attivo in tutte le fasi del ciclo cellulare, anche se in preferenza durante le fasi  $G_0$ ,  $G_1$  ed S iniziale. In caso di rottura della doppia elica di DNA, le estremità libere vengono riconosciute da fattori proteici altamente conservati nelle varie specie. Questi si legano ad una protein-chinasi DNA-dipendente formando un complesso enzimatico che richiama altri fattori come nucleasi, polimerasi e ligasi, che uniscono le due estremità libere del DNA (Lieber 2008). Si tratta di un meccanismo molto rapido ed efficiente, ma impreciso, in quanto alcuni nucleotidi possono essere inseriti o escissi per favorire la giunzione. Quindi, nel caso in cui la rottura del DNA avvenga nella porzione codificante di un gene, la riparazione può determinare una mutazione in quel gene.

Il meccanismo di ricombinazione omologa è invece attivo soprattutto nelle fasi S e  $G_2$  del ciclo cellulare; esso utilizza il cromatidio fratello come stampo per la riparazione del DNA lesa. In questo caso, un complesso proteico costituito da diversi fattori individua la rottura, rende il DNA a singolo filamento e ne determina l'appaiamento con il cromatidio fratello che contiene la sequenza omologa, che viene utilizzata come stampo per riparare il DNA danneggiato (San Filippo *et al.* 2008). Questo secondo meccanismo è più preciso del primo ma viene utilizzato più raramente dalla cellula.

Nel *genome editing*, le rotture a doppio filamento nel DNA possono essere indotte attraverso quattro modalità che usano enzimi diversi, tutti in grado di riconoscere specificamente un locus nel genoma. Tali enzimi comprendono le meganucleasi (Stoddart 2006), le nucleasi *zinc-finger* (ZFN, Pabo *et al.*

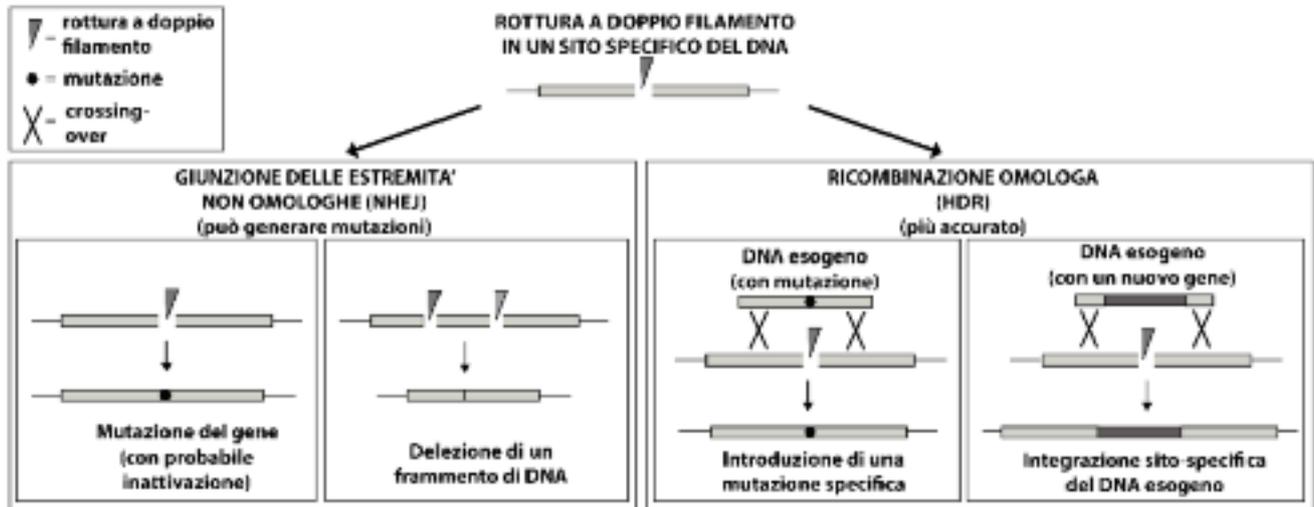


Fig. 1 - Modifiche sito-specifiche inducibili mediante *genome editing*. In seguito a una o più rotture a doppio filamento del DNA si attivano i meccanismi naturali di riparazione. Il danno al DNA viene riparato soprattutto mediante giunzione delle estremità non omologhe (*non homologous end joining*, NHEJ) che può determinare mutazioni nel gene bersaglio, il più delle volte con inattivazione (*knockout*) del gene, o, in caso di due rotture, una delezione del frammento compreso fra i due tagli. Fornendo alla cellula un DNA esogeno omologo al sito danneggiato, si può indurre il meccanismo della ricombinazione omologa (*homologous-directed repair*, HDR), che è più accurato e consente di inserire nel gene una mutazione specifica contenuta nel DNA esogeno, oppure di inserire un gene nuovo (o un frammento di esso), all'interno del DNA danneggiato.

Fig. 1 - Site-specific modifications inducible by *genome editing*. Following one or more breaks in double-stranded DNA, natural mechanisms of repair are activated. DNA damage is repaired primarily by non-homologous end joining (NHEJ) that may produce mutations in the target gene, most of which determining gene knockout, or, in case of two DNA breaks, may induce a deletion of the fragment comprised between the two breaks. Providing to the cell an exogenous DNA, homologous to the damaged site, homologous-directed repair (HDR) can be induced, which is more accurate and allows producing in the gene a specific mutation contained in the foreign DNA, or to insert a new gene (or a gene fragment), in the site occupied by the damaged DNA.

2001), le nucleasi *Transcription activator-like effector* (TALEN, Boch *et al.*, 2009; Moscou e Bogdanove, 2009), e le nucleasi guidate da RNA (RGN, van der Oost, 2013) come la Cas9, associata a brevi ripetizioni palindrome raggruppate e separate a intervalli regolari (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*, CRISPR).

Le meganucleasi presentano una struttura proteica molto complessa, in cui il dominio di taglio è incorporato nella molecola insieme al dominio di legame al DNA e pertanto questi enzimi sono meno flessibili per essere modificati al fine di legare una sequenza bersaglio scelta dallo sperimentatore. Rispetto alle meganucleasi, per gli altri enzimi la sequenza bersaglio può essere modificata più facilmente, il che li rende più flessibili e quindi più convenienti da usare, soprattutto nelle piante.

Le ZFN sono nucleasi composte da un dominio di taglio del DNA (costituito da due unità dell'enzima di restrizione *FokI*) e un dominio di legame al DNA, a sua volta formato da moduli con struttura *zinc-finger* (Urnov *et al.* 2010). Ogni modulo può legare tre o quattro nucleotidi adiacenti e il legame avviene attraverso alcuni residui aminoacidici 'chiave', che entrano direttamente in contatto con il solco maggiore del DNA. Sostituendo tali aminoacidi è possibile modifi-

care la specificità del singolo modulo. Sono stati creati moduli sintetici che riconoscono quasi tutte le 64 possibili triplette nucleotidiche, e che possono essere fusi in modo da riconoscere sequenze specifiche, quelle che vogliamo modificare. I moduli sintetici riconoscono il locus che interessa (sulla base della sua sequenza di DNA) e i due monomeri *FokI* lo tagliano. Nella pratica, la creazione del dominio di riconoscimento è un processo lungo e laborioso, in quanto ogni modulo mantiene le sue caratteristiche di legame solo nel contesto dei moduli adiacenti. Ciò significa che la specificità di un modulo può cambiare a seconda dei moduli che ad esso sono fusi e questo fenomeno può portare alla formazione di nucleasi non specifiche per la sequenza desiderata, ma che possono tagliare il genoma anche in sequenze diverse.

Anche le TALEN sono nucleasi basate sull'associazione fra due unità di nucleasi *FokI* e proteine che riconoscono e si legano in modo selettivo alle sequenze nucleotidiche prescelte. Tali proteine sono state prodotte partendo da fattori di trascrizione presenti in batteri del genere *Xanthomonas*, detti *transcription activator-like effectors* (TALE). Anche in questo sistema, il dominio di riconoscimento del DNA è modulare. Ogni monomero è capace di riconoscere un singolo nucleotide, quindi esistono solo quattro possi-

bili monomeri TALE, ciascuno in grado di riconoscere uno dei quattro nucleotidi del DNA (Boch *et al.* 2009, Mussolino e Cathomen 2012). I singoli monomeri TALE possono essere legati in serie per formare un dominio che riconosca una specifica sequenza di DNA. A differenza dei moduli *zinc-finger*, i moduli TALE non interferiscono fra loro ed è pertanto più semplice generare nucleasi artificiali basate su struttura TALE che riconoscano sequenze specifiche di DNA, utilizzando tecniche di clonaggio standard (Engler *et al.* 2008).

Infine, il sistema CRISPR/Cas (fig. 2) è attualmente il più promettente per semplicità d'uso e per specificità. A differenza di ZFN e TALEN, nel sistema CRISPR/Cas9 il riconoscimento della sequenza di DNA da modificare è operata non da proteine, ma da una sequenza di RNA. È basato sulla nucleasi Cas9, isolata in *Streptococcus pyogenes*, che contiene al suo interno una molecola "guida" di RNA e riconosce sequenze di DNA complementari all'RNA guida. Questo sistema è stato scoperto negli anni 80 in *E. coli* (Stern *et al.* 1984; Ishino *et al.* 1987) e caratterizzato come un sistema immunitario adattativo in molti batteri e archeobatteri (Wiedenheft *et al.* 2012). Quando DNA estraneo entra nel batterio, esso viene degradato dalla nucleasi Cas9. La specificità rispetto

al DNA bersaglio è legata ad una piccola (20 nucleotidi) molecola guida di RNA, il cosiddetto CRISPR-RNA (crRNA), codificato nel locus CRISPR e complementare al DNA estraneo. Per il corretto riconoscimento del sito bersaglio è anche necessaria una breve sequenza aggiuntiva (di tre nucleotidi, 5'-NGG-3') adiacente alla sequenza bersaglio, chiamata PAM (*protospacer adjacent motif*). Un secondo corto RNA, il tracrRNA (*trans-activating CRISPR-RNA*), si lega al crRNA, e forma un complesso stabile con la proteina Cas9, che presenta due domini nucleasici. Nel *genome editing*, il crRNA e il tracrRNA sono di solito fusi insieme per formare un singolo RNA-guida (sgRNA).

Nel 2013 è stato dimostrato che Cas9 di *S. pyogenes* può essere utilizzato per il *genome editing* di cellule umane in coltura, quindi anche in sistemi eucariotici (Cong *et al.* 2013; Mali *et al.* 2013). Da allora, il sistema CRISPR/Cas è diventato il sistema di maggior successo grazie alla facilità di costruire nucleasi con specificità di sequenza e per il fatto che funziona in quasi ogni organismo (Schiml e Puchta 2016). Nel *genome editing*, la molecola di sgRNA viene infatti sintetizzata sulla base della sequenza bersaglio e inserita nella cellula insieme al gene che codifica Cas9 o all'enzima stesso.

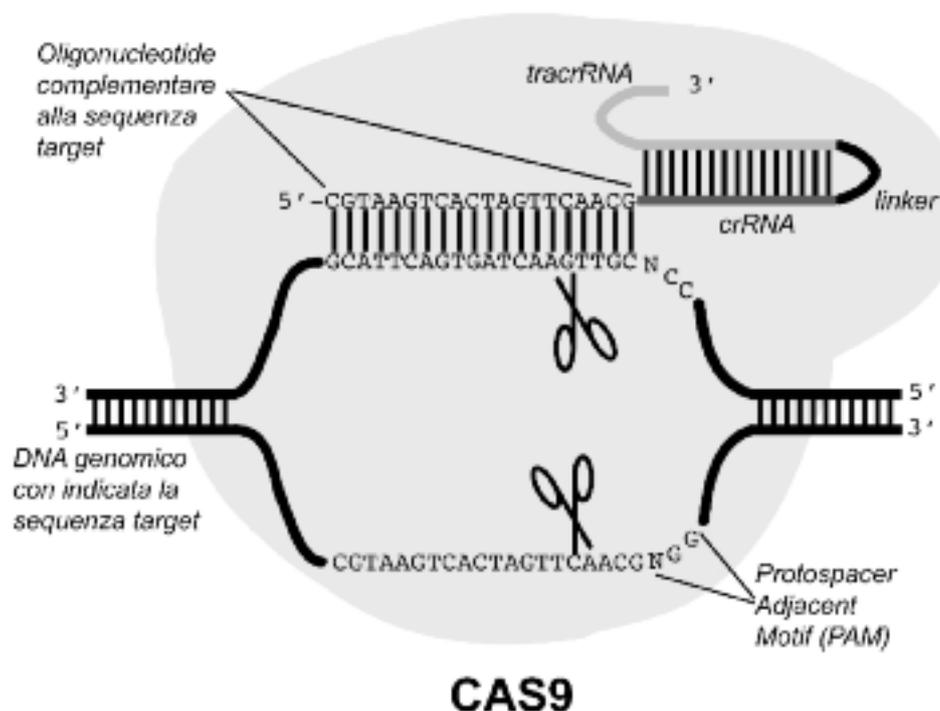


Fig. 2 - Rappresentazione schematica di una ribonucleoproteina CRISPR/Cas9 modificata per il *genome editing*. Sono indicati la sequenza bersaglio sul DNA genomico e il filamento di RNA guida, composto da tracrRNA e crRNA modificati e uniti da una sequenza linker. Il trinucleotide PAM indirizza la Cas9 verso la sequenza bersaglio. La forbice indica il sito di taglio sui due filamenti del DNA genomico.  
 Fig. 2 - Schematic representation of a CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein modified for genome editing. The target sequence on the genomic DNA and the guide RNA (made of modified tracrRNA and crRNA, joined by a linker sequence) are indicated. The PAM trinucleotide directs Cas9 toward the target sequence. The scissors indicate the cleavage sites on both strands of the genomic DNA.

Una volta avvenuta la rottura del DNA con uno dei sistemi descritti, la cellula procede con la riparazione, con conseguenze che possono essere diverse a seconda della modalità in cui la tecnologia viene usata [vedi EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO), 2012]. Normalmente, la cellula utilizza il meccanismo di NHEJ, attraverso il quale possono prodursi, nel sito della rottura del DNA, delle mutazioni, sostituzioni, inserzioni e delezioni nucleotidiche, che generalmente comportano la perdita della funzione del gene bersaglio. Quando utilizza questa modalità, il *genome editing* può essere considerato un metodo di mutagenesi biologica sito-specifica, diverso dalla mutagenesi indotta da agenti fisici o chimici con i quali le mutazioni possono colpire tutto il patrimonio genetico della cellula, in maniera casuale.

Se alla cellula, oltre alla nucleasi per tagliare il DNA in un locus specifico, viene fornita anche una molecola di DNA che funzioni da “stampo” per riparare la rottura del DNA, questa molecola potrà guidare la riparazione, attraverso il meccanismo della ricombinazione omologa. In questo caso si ottengono (nel sito bersaglio) mutazioni non casuali, ma precise e volute, per esempio specifiche sostituzioni di nucleotidi, determinate dalla sequenza usata come stampo. Con questa modalità, il *genome editing* può essere considerato un metodo di mutagenesi biologica predeterminata che modifica o corregge il gene bersaglio nel senso deciso dallo sperimentatore.

Infine, è anche possibile fornire alla cellula, oltre alla nucleasi, una molecola di DNA che possa guidare la riparazione ma che al suo interno contenga un nuovo gene, o nuovi elementi regolatori, assenti nel locus originale. In questo caso sarà prodotta una pianta transgenica o cisgenica a seconda dell'origine della sequenza introdotta. A differenza delle “normali” piante transgeniche o cisgeniche, con questa modalità l'inserimento di un nuovo gene avviene in un locus specifico, non casuale, permettendo di ridurre al minimo le conseguenze legate all'inserimento in una posizione casuale, che potrebbe avere effetti non voluti sulla funzione di altri geni.

Sono disponibili anche meganucleasi ingegnerizzate che possono essere usate per attivare un gene a livello trascrizionale. Queste meganucleasi (per esempio le cosiddette “dead Cas9”) si limitano a riconoscere il sito di interesse senza effettuare il taglio a doppio filamento del DNA e possono essere fuse con fattori di trascrizione. In questo modo, l'espressione della nucleasi nella cellula produce proteine di fusione che riconoscono il gene di interesse e, recando un dominio di attivazione della trascrizione, a loro volta inducono l'espressione di quel gene (Piatek *et al.* 2015).

#### *Altre tecnologie necessarie per il genome editing*

Oltre alla tecnologia per creare specifiche mutazioni, per applicare il *genome editing* al miglioramento genetico delle piante sono necessarie diverse tecnologie accessorie.

Innanzitutto è importante una caratterizzazione bioinformatica accurata del genoma di destinazione, per evitare di scegliere come bersaglio sequenze ripetute o aspecifiche che porterebbero a mutazioni anche in loci genomici diversi da quello programmato.

Poi, possono essere necessarie tecniche di coltura in vitro, soprattutto di coltura di protoplasti, per la produzione delle cellule che possano essere sottoposte al trattamento con le nucleasi.

Successivamente, occorrono dei sistemi per consentire il trasferimento alla cellula vegetale dei componenti necessari per il *genome editing*. Per questo possono essere usati sistemi di trasformazione per fare esprimere le nucleasi ed eventualmente la sequenza guida nelle cellule (usando *Agrobacterium*, virus, o metodi biolistici), che siano stabili o, meglio, transienti, evitando in questo caso sia l'eventuale citotossicità di nucleasi espresse stabilmente, sia la produzione di piante transgeniche, che sarebbero soggette alle note limitazioni d'uso.

Se il *genome editing* viene realizzato con sistemi transienti, il risultato è la produzione di genotipi con mutazioni nei loci previsti e senza l'inserimento di geni estranei alla specie: per questo, vengono sempre più spesso utilizzati vettori virali, che portano nella cellula vegetale la sequenza codificante la Cas9 e quella codificante l'RNA guida (che specifica dove la nucleasi deve operare e che può essere composto da più sequenze indirizzate a loci diversi, secondo un approccio *multiplexing*); una volta espletata la loro funzione e avvenuta la mutazione, sarà possibile rimuovere dalle cellule il vettore virale, senza lasciare traccia di transgeni.

Infine, una volta che la nucleasi ha agito, le cellule eventualmente mutate dovranno essere messe in condizioni di rigenerare piante, che saranno sottoposte ad analisi molecolari (per verificare se e quali mutazioni sono avvenute nel sito bersaglio) e del fenotipo (per valutare l'effetto della mutazione).

L'uso e la scelta delle diverse tecnologie per il *genome editing* dipendono in ogni caso dalla specie di interesse, dalla lunghezza del ciclo vitale, dalla fattibilità della coltura di protoplasti e della rigenerazione di piante *in vitro*, da quale nucleasi sia più efficiente per i nostri fini e dal meccanismo di riparazione necessario per ottenere il tipo di mutante che vogliamo (Baltes e Voytas 2015, Belhaj *et al.* 2013, 2015, Bortesi e Fischer 2015, Schaeffer e Nakata 2015, Voytas 2013).

## Primi risultati ottenuti

Mentre le nucleasi ZFN, TALEN e CRISPR/Cas9 hanno reso possibile modificare uno o più geni in laboratorio, lo sviluppo di varietà commerciali non è ancora giunto a compimento. Infatti, la maggior parte dei dati disponibili in letteratura riguardano l'applicazione di nucleasi a geni modello (marcatori clorofilliani, transgeni da inattivare) nel tentativo di stabilire la fattibilità e le condizioni sperimentali più adatte e di valutare le conseguenze dell'applicazione del *genome editing* nelle piante. Tuttavia, lavori recenti realizzati su caratteri la cui modifica ha una potenziale applicazione, indicano che è già iniziato il passaggio di questa tecnologia dalla fase di laboratorio a quella di campo.

A causa della scarsa efficienza di ricombinazione omologa tipica delle piante superiori, la maggior parte dei risultati finora ottenuti utilizzando il *genome editing* nelle piante coltivate sono casi di mutagenesi specifica, con inattivazione (*gene knock-out*) o mutazione del gene bersaglio, attraverso il meccanismo di riparazione NHEJ.

I primi lavori sono stati realizzati in piante modello, come *Arabidopsis*, in cui diversi geni sono stati sottoposti a *editing* con una efficienza mutazionale molto variabile, dall'1,1% all'84,8%, nella prima generazione (cfr. Song *et al.* 2016).

Nelle piante coltivate, mutazioni in geni bersaglio sono state ottenute per caratteri legati alla qualità, alla resistenza a patogeni e agli erbicidi sia in specie erbacee che arboree (tab. 1) utilizzando i tre tipi di nucleasi, anche se negli ultimi anni è il sistema CRISPR/Cas ad essersi imposto sugli altri.

Ad esempio, in riso, il *knockout* dei geni OsPDS e OsBADH2 è stato inizialmente raggiunto con tassi di mutazione del 9,4% e del 7,1% rispettivamente (Shan *et al.* 2013). Successivamente, il miglioramento della tecnologia CRISPR/Cas ha consentito di aumentare molto la frequenza di mutazioni, che ha raggiunto il tasso medio di 85,4%, con mutazioni in gran parte bialleliche e omozigoti (Ma *et al.* 2015). Utilizzando opportune combinazioni nella preparazione del sgRNA, è stato possibile utilizzare il sistema CRISPR/Cas anche per eliminare interi frammenti cromosomici (115-245 kb) con la conseguente rimozione di interi cluster di geni (Zhou *et al.* 2014).

Risultati positivi sono stati riportati anche per colture con genomi più grandi di quello del riso. In sorgo, il gene *DsRed2* è stato modificato con un tasso di mutazione del 33% (Jiang *et al.* 2013), mentre il tasso di mutazione per il gene *ZmIPK* di mais in colture di protoplasti è stato del 13,1% (Liang *et al.* 2014). Quattro geni di mais, *LIG1*, *MS26*, *MS45* e

*ALS1* sono stati modificati contemporaneamente con il sistema CRISPR/Cas9 anche se con un tasso di mutazione inferiore al 5% (Svitashev *et al.* 2015). Per quanto riguarda le piante arboree, nell'arancio dolce si è ottenuto, per il gene *PDS*, un tasso di mutazione del 3,9% (Jia e Wang 2014), mentre in pioppo, per lo stesso tipo di gene è stato ottenuto un tasso di mutazione del 51,7% (Fan *et al.* 2015).

La flessibilità e la precisione delle nucleasi disponibili, soprattutto quelle del sistema CRISPR/Cas9, le rendono adatte anche a specie con genoma poliploide. In questo senso, uno dei risultati più interessanti riguarda il frumento tenero, in cui, utilizzando la nucleasi TALEN, è stato possibile introdurre mutazioni *knockout* in tutti gli alleli del gene *TaMLO* (coinvolto nel riconoscimento di un patogeno, la *Blumeria graminis f. sp. tritici*) ottenendo la resistenza a questo fungo, carattere che non esiste nelle popolazioni naturali (Wang *et al.* 2014). L'aspetto più importante di questo lavoro è che, essendo il frumento tenero esaploide, il genoma contiene ben 6 alleli del gene *TaMLO* e gli autori sono riusciti ad inattivarli tutti, dimostrando le enormi potenzialità di questa tecnologia.

Seppure in numero minore, risultati sono stati anche ottenuti utilizzando la riparazione per ricombinazione omologa (vedi Tabella 1), con la quale si può i) modificare profondamente un gene, introducendo frammenti di DNA nei promotori dei geni e modificandone, in senso positivo o negativo, la regolazione; ii) sostituire un allele con un altro; iii) inserire un gene (della stessa specie o di un'altra) in più. Esperimenti che utilizzano la HDR sono stati condotti in diverse specie sia modello (*Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana*) che coltivate (cereali, tabacco, soia).

In alcuni casi sono stati utilizzati geni modello la cui modifica poteva dare resistenza ad erbicidi: mutazioni che conferiscono resistenza sono state introdotte nei geni *SuR* in calli di tabacco, utilizzando sia nucleasi ZFN che TALEN (Townsend *et al.* 2009, Zhang *et al.* 2013), e in geni *ALS* di mais e di soia, utilizzando CRISPR/Cas9 (Li *et al.* 2015, Svitashev *et al.* 2015). In altri casi si è proceduto all'*editing* (mediante TALEN o CRISPR/Cas) di transgeni, introducendo specifiche variazioni di sequenza in piante di orzo precedentemente trasformate con il gene *GFP* (Budhagatapalli *et al.* 2015, Shan *et al.* 2013).

Nel mais, usando la nucleasi ZFN, è stato interrotto il gene *IPK1* (coinvolto nell'accumulo di fitati) e mediante HDR vi è stata inserita una copia del gene *PAT* (codificante una fosfinotricina acetiltransferasi) ottenendo allo stesso tempo piante con basso accumulo di fitati e tolleranti la fosfinotricina (Shukla *et al.*

Tab. 1 - Esempi di specie coltivate in cui sono stati realizzati esperimenti di *genome editing*. Sono riportati il sistema di nucleasi usate nell'esperimento, il gene che è stato modificato e il carattere da esso influenzato modificato agendo su quel gene. Viene anche indicato se l'esperimento ha prodotto l'inattivazione del gene (knockout genico, KO) oppure la modifica del gene mediante l'inserimento di tratti più o meno lunghi di DNA (INS).

Tab. 1 - Examples of cultivated species in which genome editing experiments were performed. The nuclease system used in the experiment, the gene that has been edited and the trait modified by gene editing are reported. It is also indicated whether the experiment has produced the inactivation of the gene (gene knockout, KO) or its modification (by inserting a DNA fragment in the gene, INS).

Nucleasi	Specie	Carattere coinvolto	Gene bersaglio	Editing	Riferimento bibliografico
ZFN	Mais	Biosintesi fitati; resistenza erbicidi	<i>IPK1</i> ; <i>PAT</i>	KO/INS	Shukla <i>et al.</i> 2009
	Soia	RNA-silencing	<i>DICER-like</i> e altri	KO	Curtin <i>et al.</i> 2011
	Tabacco	Resistenza erbicidi	<i>ALS</i> ; <i>SuRA</i> ; <i>SuRB</i>	INS	Townsend <i>et al.</i> 2009
	Melo	--	Transgene <i>Uid</i>	KO	Peer <i>et al.</i> 2015
	Fico	--	Transgene <i>Uid</i>	KO	Peer <i>et al.</i> 2015
TALEN	Riso	Resistenza a ruggine batterica	<i>OsSWEET13-14</i>	KO	Li <i>et al.</i> 2012, Zhou <i>et al.</i> 2015a
		Fragranza	<i>OsBADH2</i>	KO	Shan <i>et al.</i> 2015
		Resistenza erbicidi	<i>OsEPSPS</i>	KO	Wang <i>et al.</i> 2015a
	Orzo	--	Transgene <i>GFP</i>	KO	Gurushidze <i>et al.</i> 2014, Budhagatapalli <i>et al.</i> 2015
		Biosintesi fitati	<i>Phytase A</i>	KO	Wendt <i>et al.</i> 2013
	Fruento	Resistenza a oidio	<i>TaMLO-A1/B1/D1</i>	KO	Wang <i>et al.</i> 2014
	Mais	Composizione cere fogliari	<i>Glossy-2</i>	KO	Char <i>et al.</i> 2015
		Pigmentazione fogliare	<i>ZmPDS</i> e altri	KO	Liang <i>et al.</i> 2014
Soia	Acidi grassi nel seme	<i>FAD2-1A</i> ; <i>FAD2-1B</i>	KO	Haun <i>et al.</i> 2014	
Patata	Accumulo di zuccheri	<i>VInv</i>	KO	Clasen <i>et al.</i> 2016	
	Resistenza erbicidi	<i>ALS1</i>	KO	Nicolia <i>et al.</i> 2015	
	Accumulo glicocalcoidi steroidei	<i>StSSR2</i>	KO	Sawai <i>et al.</i> 2014	
Pomodoro	Sviluppo della pianta	<i>PROCERA</i>	KO	Lor <i>et al.</i> 2014	
	Accumulo antocianine	<i>ANT1</i>	INS	Cermak <i>et al.</i> 2015	
CRISPR/Cas	Riso	Pigmentazione, resistenza erbicidi	<i>OsEPSPS</i> ; <i>OsPDS</i>	KO/INS	Shan <i>et al.</i> 2013, Zhang <i>et al.</i> 2014
		--	Transgene <i>GFP</i>	KO	Jiang <i>et al.</i> 2013
		Chinasi ciclina-dipendenti	<i>CDKA1-A2-B1-B2</i>	KO	Endo <i>et al.</i> 2015
		Vari	<i>OsU3-U6</i>	KO	Ma <i>et al.</i> 2015
		Resistenza erbicidi	<i>OsALS</i>	INS	Sun <i>et al.</i> 2016
	Orzo	Dormienza seme	<i>HvPM19</i>	KO	Lawrenson <i>et al.</i> 2015
	Fruento	Pigmentazione fogliare e altri	<i>TaPDS</i> ; <i>INOX</i>	KO	Upadhyay <i>et al.</i> 2013
	Mais	Resistenza erbicidi, sviluppo foglia, fertilità	<i>ALS1/2</i> ; <i>LIG1</i> ; <i>MS26/45</i> ; <i>PAT</i>	KO/INS	Svitashev <i>et al.</i> 2015
		Pigmentazione fogliare	<i>ZmPDS</i> e altri	KO	Liang <i>et al.</i> 2014
		Trasporto ioni	<i>ZmHKT1</i>	KO	Xing <i>et al.</i> 2014
	Sorgo	--	Transgene <i>GFP</i>	KO	Jiang <i>et al.</i> 2013
	Soia	Resistenza erbicidi	<i>ALS1</i>	INS	Li <i>et al.</i> 2015
		--	Transgene <i>GFP</i> e altri	KO	Jacobs <i>et al.</i> 2015
	<i>M.truncatula</i>	--	Transgene <i>GUS</i>	KO	Michno <i>et al.</i> 2015
	Tabacco	Pigmentazione fogliare	<i>Nt/NbPDS</i> ; <i>NtPDP6</i>	KO	Li <i>et al.</i> 2013, Gao <i>et al.</i> 2015
		Resistenza erbicidi	<i>ALS/SuR</i>	INS	Zhang <i>et al.</i> 2013
--		Transgene <i>GFP</i>	KO	Jiang <i>et al.</i> 2013	
Patata	Resistenza erbicidi	<i>StALS1</i>	KO	Butler <i>et al.</i> 2015	
	Sviluppo del fusto	<i>StIAA2</i>	KO	Wang <i>et al.</i> 2015b	
Pomodoro	Sviluppo fogliare	<i>SIAGO7</i>	KO	Brooks <i>et al.</i> 2014	
	Accumulo antociani	<i>ANT1</i>	INS	Cermak <i>et al.</i> 2015	
Petunia	Pigmentazione fogliare	<i>PDS</i>	KO	Zhang <i>et al.</i> 2016	
Cavolo	Crescita del fusto	<i>BoiC.GA4.a</i>	KO	Lawrenson <i>et al.</i> 2015	
Arancio	Pigmentazione fogliare	<i>CsPDS</i>	KO	Jia e Wang 2014	
Pioppo	Contenuto in lignina	<i>4CL1</i> ; <i>4CL2</i>	KO	Zhou <i>et al.</i> 2015b	
	Pigmentazione fogliare	<i>PtoPDS</i>	KO	Fan <i>et al.</i> 2015	

2009). Più recentemente, un esperimento analogo è stato condotto utilizzando il sistema CRISPR/Cas9 (Svitashev *et al.* 2015). In pomodoro, utilizzando sia nucleasi TALEN che CRISPR/Cas9, è stato inserito un promotore forte della trascrizione del gene *ant1*, ottenendo piante che accumulano antocianine nei diversi tessuti (Cermak *et al.* 2015). L'importanza di questi studi risiede nel fatto che hanno dimostrato che l'uso delle nucleasi ingegnerizzate consente di ottenere con una certa frequenza non solo riparazioni NHEJ, ma anche HDR, ampliando molto le possibilità di applicare il *genome editing* nelle piante.

Nel complesso il *genome editing* permette modifiche precise e prevedibili di geni direttamente nelle cultivar di maggior pregio, evitando le lunghe procedure tradizionali di incrocio e reincrocio, anche in considerazione del fatto che è possibile modificare più geni con un unico esperimento. L'applicazione più immediata del *genome editing* è riferibile alla inattivazione di geni mediante NHEJ: per esempio, l'inattivazione mirata di geni regolatori negativi coinvolti nello sviluppo del seme o nella resistenza a patogeni potrebbe servire ad aumentare la resa delle colture.

### Questioni aperte

Le tre nucleasi più utilizzate per la modifica del genoma nelle piante (ZFN, TALEN e CRISPR/Cas) sono state confrontate per diversi aspetti: le nucleasi CRISPR/Cas sono decisamente le più promettenti, per semplicità, accessibilità, costi, versatilità, possibilità di funzionare in più loci (*multiplexing*) (Belhaj *et al.* 2015, Bortesi e Fischer 2015, Chen e Gao 2014, Liu e Fan 2014, Mahfouz *et al.* 2014).

I numerosi lavori pubblicati negli ultimi anni dimostrano che il *genome editing*, soprattutto con la tecnologia CRISPR/Cas9, viene sempre più adottato nelle piante, e che questo strumento può consentire di approfondire molti aspetti della biologia vegetale, oltre che di migliorare le colture con maggiore velocità e precisione (Ding *et al.* 2016). Sebbene negli ultimi anni siano stati compiuti molti progressi nella tecnologia di *editing* del genoma, alcuni problemi tecnici e sociali restano da risolvere.

Dal punto di vista tecnico, i problemi includono la necessità di una maggiore efficienza del sistema, l'ottenimento di mutazioni fuori bersaglio, l'influenza della struttura della cromatina sull'efficienza dell'*editing*, i possibili effetti collaterali sui geni vicini ai geni bersaglio, l'efficienza della tecnologia in piante poliploidi (in cui si hanno molte copie dei geni bersaglio) (Schiml e Puchta 2016; Song *et al.* 2016). Nonostante queste sfide, il grande entusiasmo della comunità di

ricerca per il *genome editing* consentirà un rapido miglioramento di questa tecnologia.

Un aspetto importante riguarda la possibilità di favorire il meccanismo di ricombinazione omologa rispetto al NHEJ. Per questo è stato proposto l'uso, al posto delle nucleasi Cas9 (che producono dei tagli piatti, *blunt*, sul doppio filamento del DNA), di altre nucleasi batteriche guidate da RNA, come la Cpf1, che taglia il DNA a doppio filamento in punti sfalsati, più adesivi rispetto a quelli piatti, una caratteristica che dovrebbe rendere il *genome editing* basato sulla ricombinazione omologa più facile e più controllabile (Zetsche *et al.* 2015).

Per quanto riguarda l'attività *off-target* degli RNA guida, sebbene studi approfonditi che affrontano questo problema siano stati eseguiti in batteri e in sistemi animali, una quantizzazione precisa di questa attività non è ancora del tutto disponibile. Per le piante ci sono pochi dati: il sequenziamento di possibili siti fuori bersaglio identificati a livello bioinformatico, non ha mostrato mutazioni *off-target* in *A. thaliana*, *N. benthamiana*, grano, riso e arancio dolce (Shan *et al.* 2013; Li *et al.* 2013; Upadhyay *et al.* 2013; Zhou *et al.* 2014; Jia e Wang 2014). Al contrario, uno studio in riso ha mostrato che una putativa sequenza *off-target* risultava mutata nell'1,6% delle piante analizzate, anche se questa mutazione era comunque cinque volte meno frequente rispetto a quella trovata nel sito bersaglio (Xie e Yang, 2013).

Una soluzione per limitare l'attività fuori bersaglio, studiata in colture cellulari umane, riguarda l'uso simultaneo di due nucleasi Cas9 modificate in modo da compiere solo tagli a singolo filamento (Ran *et al.* 2013). Due nucleasi possono essere quindi guidate in due posizioni adiacenti nel genoma da due distinti sgRNA con la conseguente produzione di due tagli a singolo filamento vicini. Il risultato è un taglio a doppio filamento molto più specifico, in quanto dipendente dal riconoscimento di due sgRNA anziché uno solo. E' già stato dimostrato che questo approccio è applicabile anche alle piante (Schiml *et al.* 2014).

Sembra comunque evidente che la specificità del sgRNA dipende dal bersaglio cui è destinato, infatti alcuni sgRNA sono molto specifici e non producono nessuna mutazione fuori bersaglio. Per valutare la specificità e l'accuratezza degli sgRNA che si sono utilizzati, è importante verificare a livello bioinformatico la presenza di mutazioni *off-target* in tutto il genoma della pianta modificata (Kanchiswamy *et al.* 2016). Attualmente sono disponibili metodi di indagine in grado di rilevare frequenze di inserzione/delezione fino allo 0,1% in media, ma sarebbero necessari metodi più sensibili e convenienti in modo da rilevare

frequenze di inserzione inferiori allo 0,01% nell'intero genoma (Kanchiswamy *et al.* 2016).

Oltre al problema di evitare mutazioni fuori bersaglio, la progettazione di un sgRNA è resa più complicata dal fatto che prima della sequenza guida deve essere presente sul genoma una sequenza PAM (5'-NGG-3') (Ding *et al.* 2016), anche se queste sequenze sono molto comuni nel genoma (5-12 volte per 100 bp nelle specie modello (Xie *et al.*, 2014). Per superare la limitazione legata alle sequenze PAM, è stato proposto l'uso di diversi tipi di Cas9 che riconoscono sequenze PAM diverse rispetto alla Cas9 di *S. pyogenes* (Hirano *et al.*, 2016).

Anche la possibilità di procedere con modifiche multiple (*multiplexing*) in uno stesso esperimento viene costantemente studiata per migliorare l'efficienza di questa tecnologia. L'architettura del sistema CRISPR/Cas che consente di usare una sola nucleasi Cas9 e più sequenze guida offre la possibilità di indirizzarsi a più sequenze bersaglio contemporaneamente, come avviene in natura nei batteri (cfr. Schiml e Puchta 2016). Tuttavia, soprattutto negli esperimenti di *multiplexing*, una sovraespressione costitutiva del sistema CRISPR/Cas9 può produrre mosaici nella popolazione cellulare sottoposta a *editing*. Per superare questo problema, si cerca di limitare l'espressione della Cas9 e delle sequenze guida a tessuti o stadi di sviluppo particolari (Wang *et al.* 2015c).

Un altro problema tecnico riguarda il tipo di vettori da usare per veicolare il sistema CRISPR/Cas nelle cellule vegetali. Fra i vari vettori proposti e usati, i vettori virali sono i più promettenti (Schaeffer e Nakata 2015). Tuttavia, affinché il vettore virale possa trasferirsi da cellula a cellula è necessario che il virus abbia un genoma piccolo. Essendo il gene codificante Cas9 piuttosto grande, e dovendo inserire nel genoma virale anche la sequenza codificante l'RNA guida, il virus così ingegnerizzato potrebbe non riuscire ad arrivare alle cellule gametiche o ai loro progenitori, non consentendo quindi la trasmissione delle mutazioni alla generazione successiva (Liu e Page 2008; Ali *et al.* 2015). Una possibilità per poter usare i vettori virali, è quella di usare nucleasi più piccole. Per esempio, una Cas9 di *Staphylococcus aureus*, ha mostrato - nel genoma del topo - una efficienza simile a quella di *S. pyogenes* (Ran *et al.* 2015).

Recentemente, l'ottenimento di piante mutate è stato possibile mediante rigenerazione da foglie infettate con un Geminivirus ingegnerizzato (Ali *et al.* 2015). In questo studio è stato dimostrato che le mutazioni desiderate possono essere conseguite semplicemente mediante co-infiltrazione di molteplici virus che codificano Cas9 e uno o più sgRNA. Il *genome*

*editing* è stato osservato sia in cellule somatiche di piante transfettate nonché nella loro progenie.

La capacità di generare mutazioni bi-alleliche utilizzando vettori virali potrebbe permettere il miglioramento genetico di specie per cui il normale breeding risulta problematico, per esempio le specie per le quali è impossibile o molto problematica l'autofecondazione, le specie a sessi separati, quelle con fasi giovanili molto lunghe, quelle propagate clonalmente. Inoltre, l'utilizzo di vettori virali potrebbe rivelarsi particolarmente importante nei sistemi vegetali recalcitranti alla trasformazione o alla rigenerazione da singole cellule.

Molti problemi devono essere affrontati prima che i vettori virali possano essere applicati a tutte le specie vegetali tra cui la necessità di individuare i virus più adatti ad infettare le piante bersaglio e a modificare le cellule meristematiche o gametiche e quella di trovare un mezzo efficiente per rimuovere i genomi virali introdotti.

Per quanto riguarda gli aspetti sociali e giuridici, questi riguardano l'accettabilità dei prodotti e la questione della proprietà intellettuale dei materiali migliorati. Purché le sequenze codificanti le nucleasi e gli altri componenti del sistema non siano presenti nel genoma delle piante prodotte tramite *genome editing*, le piante modificate mediante inattivazione di geni esistenti sono indistinguibili da piante simili ottenute per selezione dalle popolazioni esistenti o tramite mutagenesi convenzionale, anzi, nel *genome editing* le mutazioni *off-target* sono di gran lunga più rare. Inoltre, è difficile anche evidenziare modifiche a carico di pochi nucleotidi e distinguerli dai genotipi originali non modificati. Per questa ragione, molti sostengono che queste piante non devono essere considerate transgeniche e, quindi, non dovrebbero rispettare i regolamenti per la realizzazione, il rilascio e la commercializzazione degli OGM (cfr. Sprink *et al.* 2015) e dovrebbero essere più accettabili dai consumatori. Recenti risultati sulla possibilità di effettuare l'*editing* dei genomi vegetali direttamente con ribonucleoproteine CRISPR-Cas9 preassemblate potrebbe ulteriormente favorire l'accettazione di questa tecnologia (Woo *et al.* 2015). Solo nel caso in cui un nuovo gene venga aggiunto utilizzando la ricombinazione omologa, il prodotto risulterà simile a quelli ottenuti mediante approcci transgenici convenzionali. Tuttavia, con la ricombinazione omologa non dovrebbero esserci i rischi associati alla potenziale, casuale interruzione di altre sequenze codificanti e/o regolatrici tipica della ingegneria genetica convenzionale (EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO), 2012).

Dal punto di vista giuridico, inoltre, la comprensione delle implicazioni sulla proprietà intellettuale relative alla immissione nel mercato di varietà derivate da *genome editing* è ancora carente (Schinkel e Schillberg 2016). In particolare, è stato osservato che il tempo che intercorre tra la concezione di nuovi strumenti per il *genome editing* e la loro disponibilità può essere molto breve; è quindi importante e urgente stabilire regolamenti sulla proprietà intellettuale dei vari metodi per la modifica del genoma. Questi devono essere affrontati a livello nazionale in quanto i brevetti sono istituiti a livello nazionale.

## Conclusioni e prospettive

Il sistema CRISPR/Cas, è emerso come il più importante strumento per il futuro della genetica grazie alla sua semplicità, versatilità ed efficienza e sta sviluppandosi con grande velocità in diverse direzioni (dalla possibilità di indurre in modo specifico l'espressione transiente di Cas9 a quella di rilasciare direttamente in cellula la proteina Cas9) che vengono testate in diverse specie in molti laboratori (Ramakrishna et al., 2014; Polstein e Gersbach, 2015). Un altro aspetto rimarchevole di questa tecnica è che essa è di gran lunga la più *user-friendly* fra le tecniche molecolari per il miglioramento genetico. Per questo, essa rivoluzionerà la ricerca di base e quella applicata e potrà migliorare una vasta gamma delle caratteristiche agronomiche delle piante coltivate.

Nella ricerca di base, le opportunità offerte da questa tecnica risiedono nella possibilità di creare rapidamente delle mutazioni in geni in cui non sono disponibili mutanti e di studiare l'effetto di esse sul fenotipo. L'uso di questo metodo comporterà quindi una comprensione più completa della funzione dei geni nelle piante. Questo approccio potrà essere applicato non solo ai geni con funzioni sconosciute, ma anche ai geni per i quali la possibilità di produrre veri mutanti *knock-out* consentirà di ampliare e completare l'attuale caratterizzazione (Schiml e Puchta 2016).

Nella ricerca applicata all'agricoltura, il *genome editing* potrà essere utilizzato per produrre varietà che presentino una migliore resistenza alle malattie, con un maggiore valore nutrizionale, e che siano in grado di sopravvivere ai cambiamenti climatici. Esso consentirà per esempio lo sviluppo di nuove colture bioenergetiche, che siano adatte a terreni marginali (Bosch e Hazen, 2013). La possibilità di modificare interi percorsi metabolici potrà consentire anche di modificare i processi cellulari per facilitare la produzione di prodotti chimici utili e di biomolecole (Schaeffer e Nakata 2015). Considerata la incredibile

rapidità di sviluppo di queste tecnologie, non sembra velleitario prevedere che nel futuro si potrà intervenire sul genoma di molte specie diverse, anche "minori", in modo "chirurgico", cioè su loci specifici, producendo varianti genetiche adatte a qualsiasi cambiamento ambientale che gli attuali genotipi non potrebbero affrontare.

Si stima che 7-15 milioni di euro e un periodo di 4-6 anni siano necessari per ottenere l'autorizzazione alla sperimentazione nell'ambiente di un transgenico, un investimento che si possono permettere solo le grandi multinazionali (Hartung e Schiemann 2014, Jones 2015, Voytas e Gao 2014). La forte (e crescente) riduzione dei costi connessi all'uso del *genome editing*, potrebbe invece consentirne l'applicazione anche a genotipi di interesse relativamente limitato, cioè tipici di determinati ambienti. In pratica, queste metodologie potrebbero essere applicate a varietà e razze locali per consentire loro di adattarsi alle nuove condizioni ambientali, mantenendo le loro caratteristiche di tipicità.

In conclusione, con la varietà di strumenti per il *genome editing* prontamente disponibili e la conoscenza approfondita dei loro meccanismi di azione, le potenzialità di applicazione di questa tecnologia alla scienza, alla biotecnologia, alla medicina e all'agricoltura sono immense. Come è stato affermato recentemente, la tecnologia del *genome editing* permetterà di riscrivere a proprio piacimento il genoma di qualsiasi specie, facendo diventare la biotecnologia una vera "scienza dell'informazione" (Estrela e Cate 2016).

## Riassunto

Il *genome editing* è una tecnologia rivoluzionaria che consente l'induzione di mutazioni sito-specifiche in tutti gli organismi viventi. In questo lavoro vengono descritti le basi biologiche di questa tecnologia e i diversi sistemi per introdurre mutazioni nel DNA utilizzando meganucleasi modificate per riconoscere sequenze specifiche, con particolare riferimento al sistema CRISPR/Cas, che è attualmente il più usato e promettente. Vengono poi riportati i maggiori risultati finora ottenuti nelle piante coltivate, i recenti avanzamenti della tecnica e le problematiche esistenti, discutendo delle prospettive che questa tecnologia apre sia per la ricerca sulle piante che per il *breeding*.

## Bibliografia

ALI Z., ABUL-FARAJ A., LI L., GHOSH N., PIATEK M., MAHJOUB A., AOUIDA M., PIATEK A., BALTES N.J., VOYTAS D.F., DINESH-KUMAR S., MAHFOUZ M.M., 2015. *Efficient virus-mediated genome editing in plants using the CRISPR/Cas9*

- system. *Mol. Plant* 8: 1288-1291.
- BALTES N.J., VOYTAS D.F., 2015. *Enabling plant synthetic biology through genome engineering*. *Trends Biotechnol.* 33: 120-131.
- BELHAJ K., CHAPARRO-GARCIA A., KAMOUN S., NEKRASOV V., 2013. *Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system*. *Plant Methods* 9: 39.
- BELHAJ K., CHAPARRO-GARCIA A., KAMOUN S., PATRON N.J., NEKRASOV V., 2015. *Editing plant genomes with CRISPR/Cas9*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 32: 76-84.
- BOCH J., SCHOLZE H., SCHORNACK S., LANDGRAF A., HAHN S., KAY S., LAHAYE T., NICKSTADT A., BONAS U., 2009. *Breaking the code of DNA binding specificity 5 of TAL-type III effectors*. *Science* 326: 1509-1512.
- BOLGER M.E., WEISSHAAR B., SCHOLZ U., STEIN N., USADEL B., MAYER K.F., 2014. *Plant genome sequencing - applications for crop improvement*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 26: 31-37.
- BORTESI L., FISCHER R., 2015. *The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond*. *Biotechnol. Adv.* 33: 41-52.
- BOSCH M., HAZEN S.P., 2013. *Lignocellulosic feedstocks: research progress and challenges in optimizing biomass quality and yield*. *Front. Plant Sci.* 4: 474.
- BOZZINI A., MOSCONI C., 1976. *Creso - a new durum wheat of interesting agronomic features*. *Genetica Agraria* 30: 153-162.
- BROOKS C., NEKRASOV V., LIPPMAN Z.B., ECK J.V., 2014. *Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated 9 system*. *Plant Physiol.* 166: 1292-1297.
- BUDHAGATAPALLI N., RUTTEN T., GURUSHIDZE M., KUMLEHN J., HENSEL G., 2015. *Targeted modification of gene function exploiting homology-directed repair of TALEN-mediated double-strand breaks in barley*. *G3: Genes-Genomes-Genetics* 5: 1857-1863.
- BUTLER N.M., ATKINS P.A., VOYTAS D.F., DOUCHES D.S., 2015. *Generation and inheritance of targeted mutations in potato (*Solanum tuberosum* L.) using the CRISPR/Cas system*. *PLoS ONE* 10: e0144591.
- CAUSSE M., DESPLAT N., PASCUAL M., LE PASLIER M.C., SAUVAGE C., BAUCHET G., BERARD A., BOUNON R., TCHOUMAKOV M., BRUNEL D., BOUCHET J.P., 2013. *Whole genome resequencing in tomato reveals variation associated with introgression and breeding events*. *BMC Genomics* 14: 791.
- CERMAK T., BALTES N.J., CEGAN R., ZHANG Y., VOYTAS D.F., 2015. *High-frequency, precise modification of the tomato genome*. *Genome Biol.* 16: 232.
- CHAR S.N., UNGER-WALLACE E., FRAME B., BRIGGS S.A., MAIN M., SPALDING M.H., VOLLBRECHT E., WANG K., YANG B., 2015. *Heritable sitespecific mutagenesis using TALENs in maize*. *Plant Biotechnol. J.* 13: 1002-1010.
- CHEN K., GAO C., 2014. *Targeted genome modification technologies and their applications in crop improvements*. *Plant Cell Rep.* 33: 575-583.
- CLASEN B.M., STODDARD T.J., LUO S., DEMOREST Z.L., LI J., CEDRONE F., TIBEBU R., DAVISON S., RAY E.E., DAULHAC A., COFFMAN A., YABANDITH A., RETTERATH A., HAUN W., BALTES N.J., MATHIS L., VOYTAS D.F., ZHANG F., 2016. *Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout*. *Plant Biotechnol. J.* 14: 169-176.
- COMAI L., YOUNG K., TILL B.J., REYNOLDS S.H., GREENE E.A., CODOMO C.A., ENNS L.C., JOHNSON J.E., BURTNER C., ODDEN A.R., HENIKOFF S., 2004. *Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by Ecotilling*. *Plant Journal* 37: 778-786.
- CONG L., RAN F.A., COX D., LIN S., BARRETTO R., HABIB N., HSU P.D., WU X., JIANG W., MARRAFFINI L.A., ZHANG F., 2013. *Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems*. *Science* 339: 819-823.
- CURTIN S.J., ZHANG F., SANDER J.D., HAUN W.J., STARKER C., BALTES N.J., REYON D., DAHLBORG E.J., GOODWIN M.J., COFFMAN A.P., DOBBS D., JOUNG J.K., VOYTAS D.F., STUPAR R.M., 2011. *Targeted mutagenesis of duplicated genes in soybean with zinc-finger nucleases*. *Plant Physiol.* 156: 466-473.
- DE SOUZA N., 2012. *Primer: genome editing with engineered nucleases*. *Nature Methods* 9: 27.
- DING Y., LI H., LING-LING C., XIE K., 2016. *Recent advances in genome editing using CRISPR/Cas9*. *Front. Plant Sci.* 7: 703.
- EFSA PANEL ON GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS (GMO), 2012. *Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed using Zinc Finger Nuclease 3 and other Site-Directed Nucleases with similar function*. *EFSA J.* 10: 2943.
- ENDO M., MIKAMI M., TOKI S., 2015. *Multigene knockout utilizing off-target mutations of the CRISPR/Cas9 system in rice*. *Plant Cell Physiol.* 56: 41-47.
- ENGLER C., KANDZIA R., MARILLONNET S., 2008. *A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability*. *PLoS One* 3: e3647.
- ESTRELA R., CATE J.H.D., 2016. *Energy biotechnology in the CRISPR-Cas9 era*. *Curr. Opin. Biotech.* 38: 79-84.
- FAN D., LIU T., LI C., JIAO B., LI S., HOU Y., LUO K., 2015. *Efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in Populus in the first generation*. *Sci. Rep.* 5: 12217.
- GAJ T., GERSBACH C.A., BARBAS C.F., 2013. *ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering*. *Trends Biotechnol.* 31: 397-405.
- GAO J., WANG G., MA S., XIE X., WU X., ZHANG X., WU Y., ZHAO P., XIA Q., 2015. *CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in Nicotiana tabacum*. *Plant Mol. Biol.* 87: 99-110.
- GURUSHIDZE M., HENSEL G., HIEKEL S., SCHEDEL S., VALKOV V., KUMLEHN J., 2014. *True-breeding targeted gene knock-out in barley using designer TALE-nuclease in haploid cells*. *PLoS ONE* 9: e92046.
- HAMILTON J.P., BUELL C.R., 2012. *Advances in plant genome sequencing*. *Plant Journal* 70: 177-190.
- HARTUNG F., SCHIEMANN J., 2014. *Precise plant breeding using new genome editing techniques: opportunities, safety and regulation in the EU*. *Plant Journal* 78: 742-752.
- HAUN W., COFFMAN A., CLASEN B.M., DEMOREST Z.L., LOWY A., RAY E., RETTERATH A., STODDARD T., JUILLERAT A., CEDRONE F., MATHIS L., VOYTAS D.F., ZHANG F., 2014. *Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family*. *Plant Biotechnol. J.* 12: 934-940.
- HIRANO H., GOOTENBERG J.S., HORII T., ABUDAYYEH O.O., KIMURA M., HSU P.D., NAKANE T., ISHITANI R., HATADA I., ZHANG F., NISHIMASU H., NUREKI O., 2016. *Structure and engineering of Francisella novicida Cas9*. *Cell* 164: 950-961.
- HOLME I.B., WENDT T., HOLM P.B., 2013. *Intragenesis and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development*. *Plant Biotechnol. J.* 11: 395-407.
- HYNES H.P., 1989. *Biotechnology in agriculture: an analysis of selected technologies and policy in the United States*. *Reprod. Genet. Engineer.* 1: 39-49.
- ISHINO Y., SHINAGAWA H., MAKINO K., AMEMURA M., NAKATA A., 1987. *Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product*. *J. Bacteriol.* 169: 5429-5433.
- JACOBS T.B., LAFAYETTE P.R., SCHMITZ R.J., PARROTT W.A., 2015. *Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9*. *BMC Biotechnol.* 15: 16.
- JIA H.G., WANG N., 2014. *Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA*. *PLoS One* 9: e93806.
- JIANG W.Z., ZHOU H.B., BI H.H., FROMM M., YANG B., WEEKS D.P., 2013. *Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice*. *Nucl. Acids Res.* 41: 1-12.
- JONES H.D., 2015. *Regulatory uncertainty over genome editing*. *Nat. Plants* 1: 14011.

- KANCHISWAMY C.N., MAFFEI M., MALNOY M., VELASCO R., KIM J.S., 2016. *Fine-tuning next-generation genome editing tools*. Trends Biotechnol. in press, doi:10.1016/j.tibtech.2016.03.007.
- LAWRENSEN T., SHORINOLA O., STACEY N., LI C., OSTERGAARD L., PATRON N., UAUY C., HARWOOD W., 2015. *Induction of targeted, heritable mutations in barley and Brassica oleracea using RNA-guided Cas9 nuclease*. Genome Biol. 16: 258.
- LI T., LIU B., SPALDING M.H., WEEKS D.P., YANG B., 2012. *High efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice*. Nat. Biotechnol. 30: 390-392.
- LI J., NORVILLE J.E., AACH J., MCCORMACK M., ZHANG D., BUSH J., CHURCH G.M., SHEEN J., 2013. *Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana using guide RNA and Cas9*. Nat. Biotechnol. 31: 688-691.
- LI Z., LIU Z.B., XING A., MOON B.P., KOELLHOFFER J.P., HUANG L., WARD R.T., CLIFTON E., FALCO S.C., CIGAN A.M., 2015. *Cas9-guide RNA directed genome editing in soybean*. Plant Physiol. 169: 960-970.
- LIANG Z., ZHANG K., CHEN K.L., GAO C.X., 2014. *Targeted mutagenesis in Zea mays using TALENs and the CRISPR/Cas system*. J. Genet. Genomics 41: 63-68.
- LIEBER M.R., 2008. *The mechanism of human nonhomologous DNA end joining*. J. Biol. Chem. 283: 1-5.
- LIN T., ZHU G., ZHANG J., XU X., YU Q., ZHENG Z., ZHANG Z., LUN Y., LI S., WANG X., HUANG Z., LI J., ZHANG C., WANG T., ZHANG Y., WANG A., ZHANG Y., LIN K., LI C., XIONG G., XUE Y., MAZZUCATO A., CAUSSE M., FEI Z., GIOVANNONI J.J., CHETELAT R.T., ZAMIR D., STADLER T., LI J., YE Z., DU Y., HUANG S., 2014. *Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding*. Nat. Genet. 46: 1220-1226.
- LIU E., PAGE J.E., 2008. *Optimized cDNA libraries for virus-induced gene silencing (VIGS) using tobacco rattle virus*. Plant Methods 4: 5.
- LIU L., FAN X.D., 2014. *CRISPR-Cas system: a powerful tool for genome engineering*. Plant Mol. Biol. 85: 209-218.
- LOR V.S., STARKER C.G., VOYTAS D.F., WEISS D., OLSZEWSKI N.E., 2014. *Targeted mutagenesis of the tomato PROCERA gene using transcription activator-like effector nucleases*. Plant Physiol. 166: 1288-1291.
- MA X.L., ZHANG Q.Y., ZHU Q.L., LIU W., CHEN Y., QIU R., WANG B., YANG Z.F., LI H.Y., LIN Y.R., XIE Y.Y., SHEN R.X., CHEN S.F., WANG Z., CHEN Y.L., GUO J.L., CHEN L., ZHAO X.C., DONG Z.C., LIU Y.G., 2015. *A robust CRISPR/Cas9 system for convenient high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants*. Mol. Plant 8: 1274-1284.
- MAHFOUZ M.M., PIATEK A., STEWART C.N., 2014. *Genome engineering via TALENs and CRISPR/Cas9 systems: challenges and perspectives*. Plant Biotechnol. J. 12: 1006-1014.
- MALI P., YANG L., ESVELT K.M., AACH J., GUELL M., DICARLO J.E., NORVILLE J.E., CHURCH G.M., 2013. *RNA-guided human genome engineering via Cas9*. Science 339: 823-826.
- MASCHER M., RICHMOND T.A., GERHARDT D.J., HIMMELBACH A., CLISSOLD L., SAMPATH D., AYLING S., STEURNAGEL B., PFEIFER M., D'ASCENZO M., AKHUNOV E.D., HEDLEY P.E., GONZALES A.M., MORRELL P.L., KILLIAN B., BLATTNER F.R., SCHOLZ U., MAYER K.F., FLAVELL A.J., MUEHLBAUER G.J., WAUGH R., JEDDELOH J.A., STEIN N., 2013. *Barley whole exome capture: a tool for genomic research in the genus Hordeum and beyond*. Plant Journal 76: 494-505.
- MICHAEL T.P., VANBUREN R., 2015. *Progress, challenges and the future of crop genomes*. Curr. Opin. Plant Biol. 24: 71-81.
- MICHNO J.M., WANG X., LIU J., CURTIN S.J., KONO T.J., STUPAR R.M., 2015. *CRISPR/Cas mutagenesis of soybean and Medicago truncatula using a new web-tool and a modified Cas9 enzyme*. GM Crops Food 6: 243-252.
- MOSCOU M.J., BOGDANOVA A.J., 2009. *A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors*. Science 326: 1501.
- MUSSOLINO C., CATHOMEN T., 2012. *TALE nucleases: tailored genome engineering made easy*. Curr. Opin. Biotechnol. 23: 644-650.
- NEVES L.G., DAVIS J.M., BARBAZUK W.B., KIRST M., 2013. *Whole exome targeted sequencing of the uncharacterized pine genome*. Plant Journal 75: 146-156.
- NICOLIA A., PROUX-WERA E., AHMAN I., ONKOKESUNG N., ANDERSSON M., ANDREASSON E., ZHU L.H., 2015. *Targeted gene mutation in tetraploid potato through transient TALEN expression in protoplasts*. J. Biotechnol. 204: 17-24.
- PABO C.O., PEISACH E., GRANT R.A., 2001. *Design and selection of novel Cys2His2 zinc finger proteins*. Annu. Rev. Biochem. 70: 313-340.
- PEER R., RIVLIN G., GOLOBOVITCH S., LAPIDOT M., GAL-ON A., VAINSTEIN A., TZFIRA T., FLAISHMAN M.A., 2015. *Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in perennial fruit trees*. Planta 241: 941-951.
- PIATEK A., ALI Z., BAAZIM H., LI L., ABULFARAJ A., AL-SHAREEF S., AOUIDA M., MAHFOUZ M.M., 2015. *RNA-guided transcriptional regulation in planta via synthetic dCas9-based transcription factors*. Plant Biotechnol. J. 13: 578-589.
- POLSTEIN L.R., GERSBACH C.A., 2015. *A light-inducible CRISPR-Cas9 system for control of endogenous gene activation*. Nat. Chem. Biol. 11: 198-200.
- PUCHTA H., FAUSER F., 2014. *Synthetic nucleases for genome engineering in plants: prospects for a bright future*. Plant Journal 78: 727-741.
- RAMAKRISHNA S., KWAKU DAD A.B., BELOOR J., GOPALAPPA R., LEE S.K., KIM H., 2014. *Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA*. Genome Res. 24: 1020-1027.
- RAN F.A., HSU P.D., LIN C., GOOTENBERG J.S., KONERMANN S., TREVINO A.E., SCOTT D.A., INOUE A., MATOBA S., ZHANG Y., ZHANG F., 2013. *Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity*. Cell 154: 1380-1389.
- RAN F.A., CONG L., YAN W.X., SCOTT D.A., GOOTENBERG J.S., KRIZ A.J., ZETSCHKE B., SHALEM O., WU X., MAKAROVA K.S., KOONIN E.V., SHARP P.A., ZHANG F., 2015. *In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9*. Nature 520: 186-191.
- RIBAUT J.M., HOISINGTON D.A., 1998. *Marker assisted selection: new tools and strategies*. Trends Plant Sci. 3: 236-239.
- RINALDO A.R., AYLIFFE M., 2015. *Gene targeting and editing in crop plants: a new era of precision opportunities*. Mol. Breeding 35: 1-15.
- SAINTENAC C., JIANG D., AKHUNOV E.D., 2011. *Targeted analysis of nucleotide and copy number variation by exon capture in allotetraploid wheat genome*. Genome Biol. 12: R88.
- SAN FILIPPO J., SUNG P., KLEIN H., 2008. *Mechanism of eukaryotic homologous recombination*. Ann. Rev. Biochem. 77: 229-257.
- SAWAI S., OHYAMA K., YASUMOTO S., SEKI H., SAKUMA T., YAMAMOTO T., TAKEBAYASHI Y., KOJIMA M., SAKAKIBARA H., AOKI T., MURANAKA T., SAITO K., UMEMOTO N., 2014. *Sterol side chain reductase 2 is a key enzyme in the biosynthesis of cholesterol, the common precursor of toxic steroidal glycoalkaloids in potato*. Plant Cell 26: 3763-3774.
- SCHAEFFER S.M., NAKATA P.A., 2015. *CRISPR/Cas9-mediated genome editing and gene replacement in plants: transitioning from lab to field*. Plant Science 240: 130-142.
- SCHIML S., FAUSER F., PUCHTA H., 2014. *The CRISPR/Cas system can be used as nuclease for in planta gene targeting and as paired nickases for directed mutagenesis in Arabidopsis resulting in heritable progeny*. Plant Journal 80: 1139-1150.
- SCHIML S., PUCHTA H., 2016. *Revolutionizing plant biology: multiple ways of genome engineering by CRISPR/Cas*. Plant Methods 12: 8.
- SCHINKEL H., SCHILLBERG S., 2016. *Genome editing: intellectual*

- property and product development in plant biotechnology. *Plant Cell Rep.* In press, DOI 10.1007/s00299-016-1988-9.
- SHAN Q.W., WANG Y.P., LI J., ZHANG Y., CHEN K.L., LIANG Z., ZHANG K., LIU J.X., XI J.J., QIU J.L., GAO C.X., 2013. *Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system.* *Nat. Biotechnol.* 31: 686-688.
- SHAN Q.W., ZHANG Y., CHEN K., ZHANG K., GAO C., 2015. *Creation of fragrant rice by targeted knockout of the OsBADH2 gene using TALEN technology.* *Plant Biotechnol. J.* 13: 791-800.
- SHUKLA V.K., DOYON Y., MILLER J.C., DEKELVER R.C., MOEHLE E.A., WORDEN S.E., MITCHELL J.C., ARNOLD N.L., GOPALAN S., MENG X., CHOI V.M., ROCK J.M., WU Y.Y., KATIBAH G.E., ZHIFANG G., MCCASKILL D., SIMPSON M.A., BLAKESLEE B., GREENWALT S.A., BUTLER H.J., HINKLEY S.J., ZHANG L., REBAR E.J., GREGORY P.D., URNOV F.D., 2009. *Precise genome modification in the crop species Zea mays using zinc-finger nucleases.* *Nature* 459: 437-441.
- SONG G., JIA M., CHEN K., KONG X., KHATTAK B., XIE C., LI A., MAO L., 2016. *CRISPR/Cas9: A powerful tool for crop genome editing.* *The Crop J.* 4: 75-82.
- SPRINK T., METJE J., HARTUNG F., 2015. *Plant genome editing by novel tools: TALEN and other sequence specific nucleases.* *Curr. Opin. Biotechnol.* 32: 47-53.
- STERN M.J., AMES G.F., SMITH N.H., ROBINSON E.C., HIGGINS C.F., 1984. *Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome.* *Cell* 37: 1015-26.
- STODDARD B.L., 2006. *Homing endonuclease structure and function.* *Quart. Rev. Biophys.* 38: 49-95.
- SUN Y., ZHANG X., WU C., HE Y., MA Y., HOU H., GUO X., DU W., ZHAO Y., XIA L., 2016. *Engineering herbicide-resistant rice plants through CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination of acetolactate synthase.* *Mol Plant.* 4: 628-631.
- SVITASHEV S., YOUNG J.K., SCHWARTZ C., GAO H.R., FALCO S.C., CIGAN A.M., 2015. *Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA.* *Plant Physiol.* 169: 931-945.
- TOWNSEND J.A., WRIGHT D.A., WINFREY R.J., FU F., MAEDER M.L., JOUNG J.K., VOYTAS D.F., 2009. *High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases.* *Nature* 459: 442-445.
- UPADHYAY S.K., KUMAR J., ALOK A., TULI R., 2013. *RNA-guided genome editing for target gene mutations in wheat.* *G3: Genes - Genomes - Genetics* 3: 2233-2238.
- URNOV F.D., REBAR E.J., HOLMES M.C., ZHANG H.S., GREGORY P.D., 2010. *Genome editing with engineered zinc finger nucleases.* *Nature Rev. Genet.* 11: 636-646.
- VAN DER OOST J., 2013. *Molecular biology. New tool for genome surgery.* *Science* 339: 768-770.
- VOYTAS D.F., 2013. *Plant genome engineering with sequence-specific nucleases.* *Annu. Rev. Plant Biol.* 64: 327-350.
- VOYTAS D.F., GAO C., 2014. *Precision genome engineering and agriculture: opportunities and regulatory challenges.* *PLoS Biol.* 12: e1001877.
- WANG Y., CHENG X., SHAN Q., ZHANG Y., LIU J., GAO C., QIU J.L., 2014. *Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew.* *Nat. Biotechnol.* 32: 947-951.
- WANG M., LIU Y., ZHANG C., LIU J., LIU X., WANG L., WANG W., CHEN H., WEI C., YE X., LI X., TU J., 2015a. *Gene editing by cotransformation of TALEN and chimeric RNA/DNA oligonucleotides on the rice OsEPSPS gene and the inheritance of mutations.* *PLoS ONE* 10: e0122755.
- WANG S., ZHANG S., WANG W., XIONG X., MENG F., CUI X., 2015b. *Efficient targeted mutagenesis in potato by the CRISPR/Cas9 system.* *Plant Cell Rep.* 34: 1473-1476.
- WANG Z.P., XING H.L., DONG L., ZHANG H.Y., HAN C.Y., WANG X.C., CHEN Q.J., 2015c. *Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in Arabidopsis in a single generation.* *Genome Biol.* 16: 144.
- WENDT T., HOLM P.B., STARKER C.G., CHRISTIAN M., VOYTAS D.F., BRINCH-PEDERSEN H., HOLME I.B., 2013. *TAL effector nucleases induce mutations at a pre-selected location in the genome of primary barley transformants.* *Plant Mol. Biol.* 83: 279-285.
- WIEDENHEFT B., STERNBERG S.H., DOUDNA J.A., 2012. *RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea.* *Nature* 482: 331-338.
- WOO J.W., KIM J., KWON S.I., CORVALAN C., CHO S.W., KIM H., KIM S.G., KIM S.T., CHOE S., KIM J.S., 2015. *DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins.* *Nat. Biotechnol.* 33: 1162-1164.
- XIE K., YANG Y., 2013. *RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system.* *Mol Plant.* 6: 1975-1983.
- XIE K., ZHANG J., YANG Y., 2014. *Genome-wide prediction of highly specific guide RNA spacers for CRISPR-Cas9-mediated genome editing in model plants and major crops.* *Mol. Plant* 7: 923-926.
- XING H.L., DONG L., WANG Z.P., ZHANG H.Y., HAN C.Y., LIU B., WANG X.C., CHEN Q., 2014. *A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants.* *BMC Plant Biol.* 14: 327.
- ZETSCHKE B., GOOTENBERG J.S., ABUDAYYEH O.O., SLAYMAKER I.M., MAKAROVA K.S., ESSLETZBICHLER P., VOLZ S.E., JOUNG J., VAN DER OOST J., REGEV A., KOONIN E.V., ZHANG F., 2015. *Cpf1 is a single RNA guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system.* *Cell* 163: 759-771.
- ZHANG Y., ZHANG F., LI X., BALLER J.A., QI Y., STARKER C.G., BOGDANOVA A.J., VOYTAS D.F., 2013. *Transcription activator-like effector nucleases enable efficient plant genome engineering.* *Plant Physiol.* 161: 20-27.
- ZHANG H., ZHANG J., WEI P., ZHANG B., GOU F., FENG Z., MAO Y., YANG L., ZHANG H., XU N., ZHU J.K., 2014. *The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation.* *Plant Biotechnol. J.* 12: 797-807.
- ZHANG B., YANG X., YANG C., LI M., GUO Y., 2016. *Exploiting the CRISPR/Cas9 system for targeted genome mutagenesis in petunia.* *Sci. Rep.* 6: 20315.
- ZHOU H.B., LIU B., WEEKS D.P., SPALDING M.H., YANG B., 2014. *Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice.* *Nucl. Acids Res.* 42: 10903-10914.
- ZHOU J., PENG Z., LONG J., SOSSO D., LIU B., EOM J.S., HUANG S., LIU S., VERA CRUZ C., FROMMER W.B., WHITE F.F., YANG B., 2015a. *Gene targeting by the TAL effector PthXo2 reveals cryptic resistance gene for bacterial blight of rice.* *Plant Journal* 82: 632-643.
- ZHOU X., JACOBS T.B., XUE L.J., HARDING S.A., TSAI C.J., 2015b. *Exploiting SNPs for biallelic CRISPR mutations in the outcrossing woody perennial Populus reveals 4-coumarate: CoA ligase specificity and redundancy.* *New Phytol.* 208: 298-301.