

# **Pasado, presente y futuro de la Edición Genómica**

Aplicaciones de la Ingeniería Genética

Enero de 2019

**Máster en Genética y Evolución**  
(Especialidad Agroalimentaria)

# La justicia europea pone trabas a la edición genética en plantas

El tribunal europeo sentencia que los organismos modificados con CRISPR deben ser regulados como transgénicos



NUÑO DOMÍNGUEZ

25 JUL 2018 - 18:46 CEST



Carga de un camión con maíz transgénico del tipo BT-corn, en Rockton (EE UU). GETTY

EL PAÍS

CIENCIA

En una sentencia [hecha pública hoy](#), el tribunal europeo considera que los organismos generados por mutagénesis son Organismos Modificados Genéticamente (OMG) al entender que esta técnica altera la genética de los organismos de una forma que no se da en la naturaleza. Esto supone que las plantas y otros organismos cuyo genoma se modifica con la técnica de edición genética CRISPR-Cas 9 y otras similares estarán reguladas por la directiva comunitaria de 2001 que controla el desarrollo y cultivo de organismos transgénicos. La norma dictamina por ejemplo que cada nuevo OMG debe ser aprobado tras un análisis de su posible impacto en la salud y en el medio ambiente y someterse a medidas especiales de trazabilidad y etiquetado.

El tribunal hace una excepción con los organismos cuyo genoma se modifica por mutagénesis con técnicas convencionales como la radiación, ampliamente utilizada en el mercado agrícola para generar mutaciones beneficiosas desde un punto de vista comercial. El razonamiento del tribunal es que las nuevas técnicas de edición genética consiguen efectos similares a los de la transgénesis y permiten crear variantes modificadas genéticamente “a un ritmo y en proporciones que no pueden compararse con las resultantes de la aplicación de métodos convencionales de mutagénesis aleatoria”. El tribunal argumenta que excluir estas nuevas técnicas de edición genética de la normativa sobre transgénicos minaría el objetivo declarado de esta norma de “evitar efectos adversos para la salud humana y el medio ambiente”.

[Sentencia 25 julio 2018](#)

## Mutagénesis

- Sustancias químicas
- Radiación

## Interferencia por ARN

## Transgénesis

### ***Integración de ADN exógeno mediada por:***

- Plásmido Ti *Agrobacterium tumefaciens*
- Enzimas de restricción (mutagénesis REMI)
- Transposones
- Recombinasas

### ***Edición de genomas con nucleasas sitio-dirigidas:***

- Meganucleasas
- Dedos de zinc (ZFNS o ZN)
- TALEN
- CRISPR-Cas9

# Mutagénesis

Uso de mutágenos como la radioactividad para inducir mutaciones aleatorias, creando rasgos deseados.



*La radiación fue usada para producir un color más intenso en el pomelo rojo.*

---

SCIENCE

# *Useful Mutants, Bred With Radiation*

By WILLIAM J. BROAD AUG. 28, 2007



Pierre Lagoda, the head of plant breeding and genetics at the International Atomic Energy Agency, showing mutated plants at a greenhouse in Austria. Herwig Prammer for The New York Times

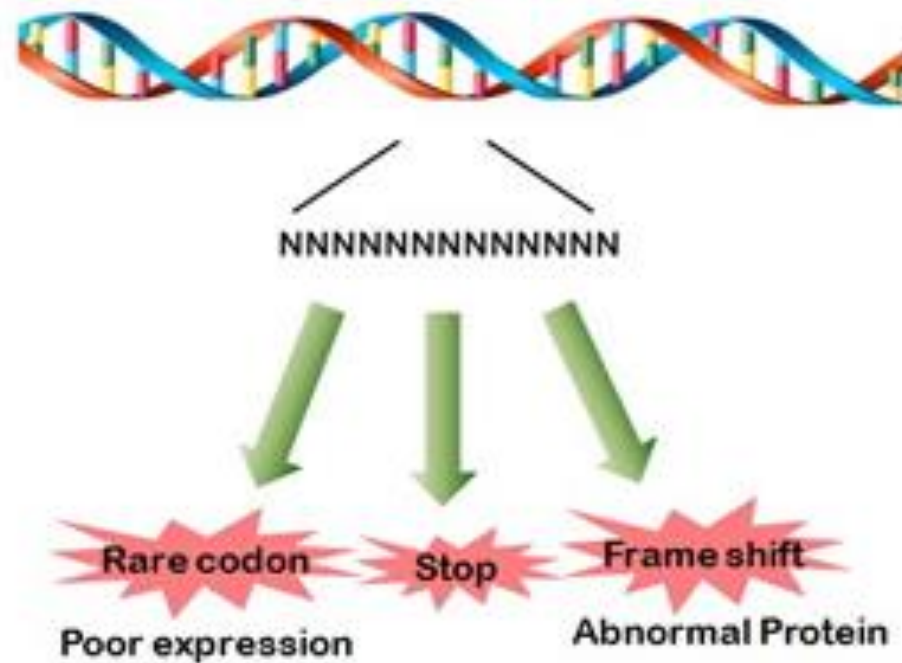
**Químicos con poder mutagénico  
Radiación**

<http://www.nytimes.com/2007/08/28/science/28crop.html?pagewanted=print& r=0>

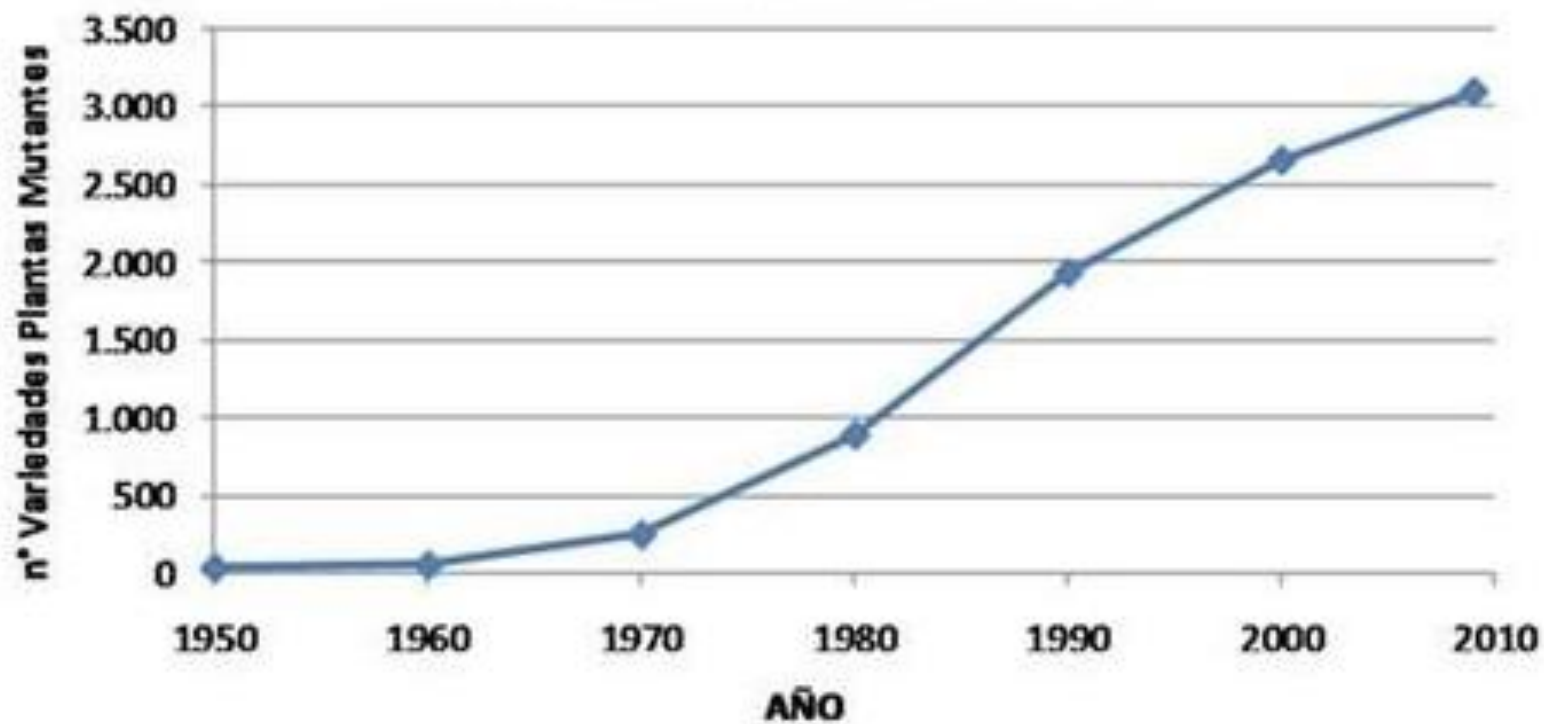
Luz ultravioleta o agentes alquilantes monofuncionales (pueden reaccionar con solo una cadena de ADN) (MNNG o EMS): **sustitución de bases**

Radiación ionizante o agentes alquilantes bifuncionales (forman enlaces covalentes cruzados con ambas cadenas de ADN) (DEB o DEO): **deleciones**

## Random mutagenesis

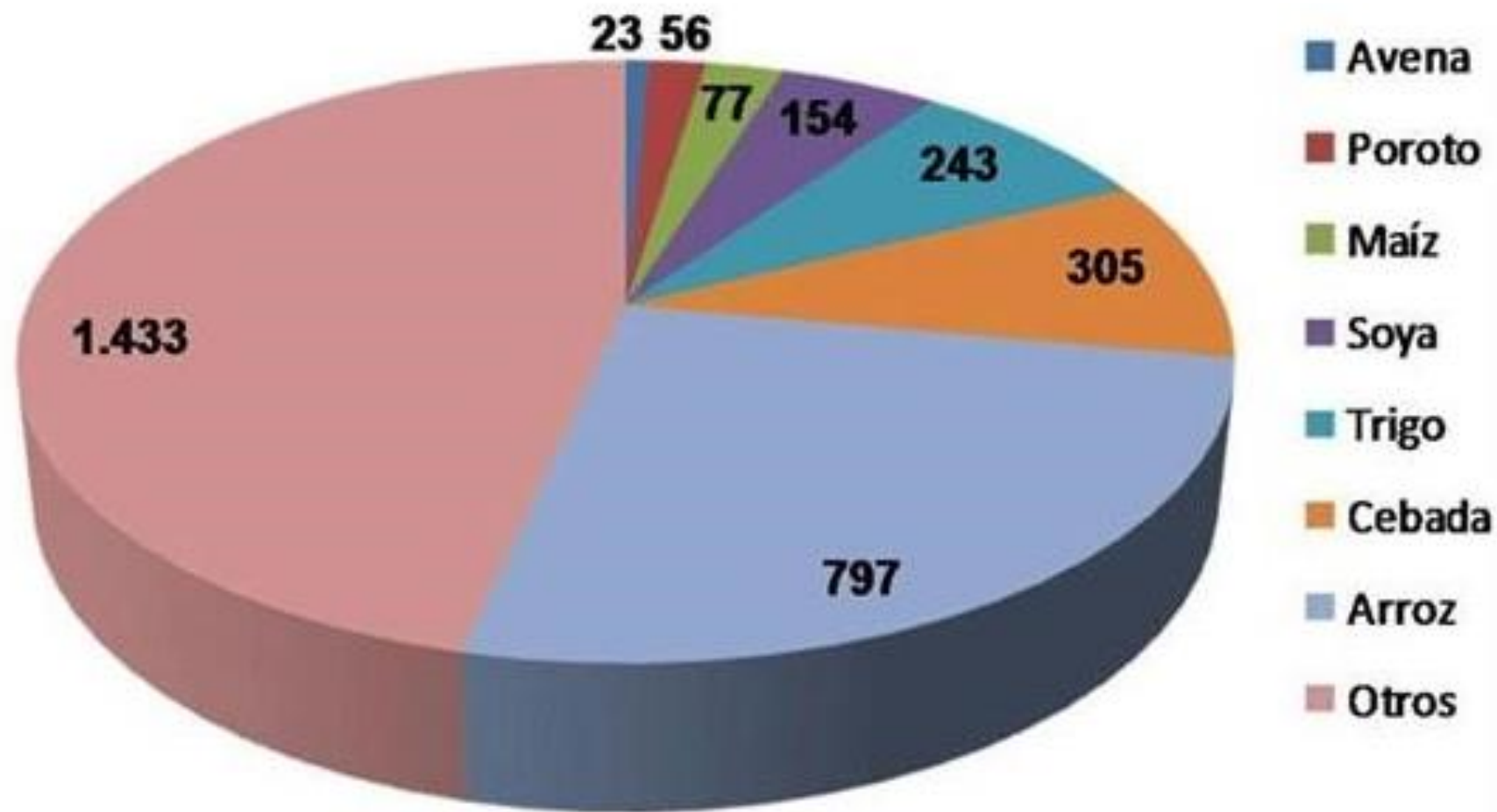


## Variedades Vegetales Obtenidas por Mutagénesis y Comercializadas a Nivel Mundial



Elaborado a partir de: <http://mvgs.iaea.org/>

N° Variedades Obtenidas por Mutagénesis de los Principales Alimentos (Total = 3.088)



Elaborado a partir de: <http://mvgs.iaea.org/>



## Tecnología Recombinante:

- Aislamiento de genes de interés
- Modificación de los mismos
- Integración del ADN recombinante en el organismo de interés
- Regeneración de un organismo completo



## Estándares de calidad de un buen vector



- Ser capaz de alcanzar **tejidos** adecuados para la **propagación**.
- Liberar el ADN** de forma eficiente.
- Incluir agentes que permitan la **identificación de tejidos** con el transgén.
- Proporcionar un **porcentaje razonable de transgénesis** de la forma más simple, eficiente, reproducible y económica posible.
- Insertarse de forma **específica**.

## Algunas formas de “delivery”:

- **Electroporación:** usando pulsos eléctricos o descargas.
- **Biobalística:** bombardeo con esferas de oro o tungsteno.
- **Inyección directa:** del núcleo con una microaguja.
- **Liposomas:** que son integrados por la célula.

Review Article

# Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches

Christopher A. Lino, Jason C. Harper, James P. Carney & Jerilyn A. Timlin  

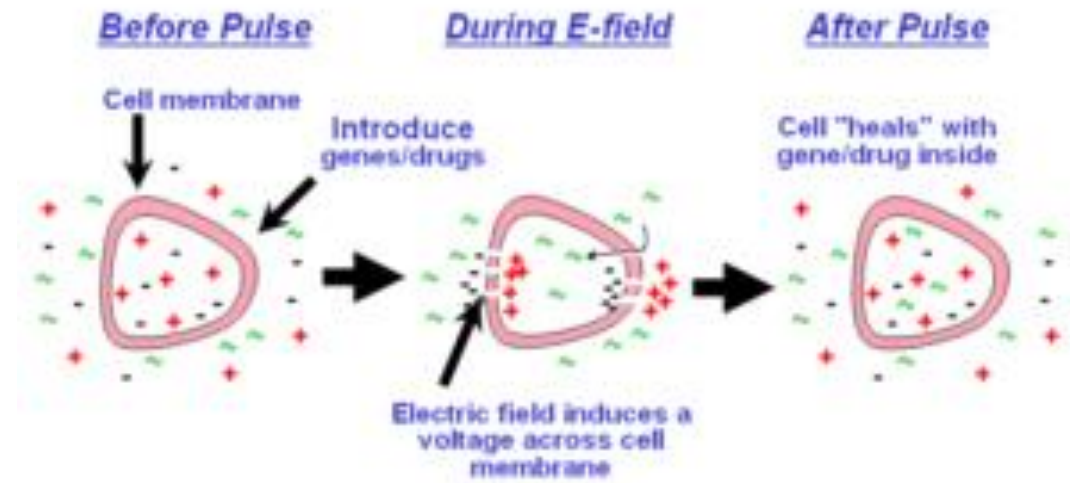
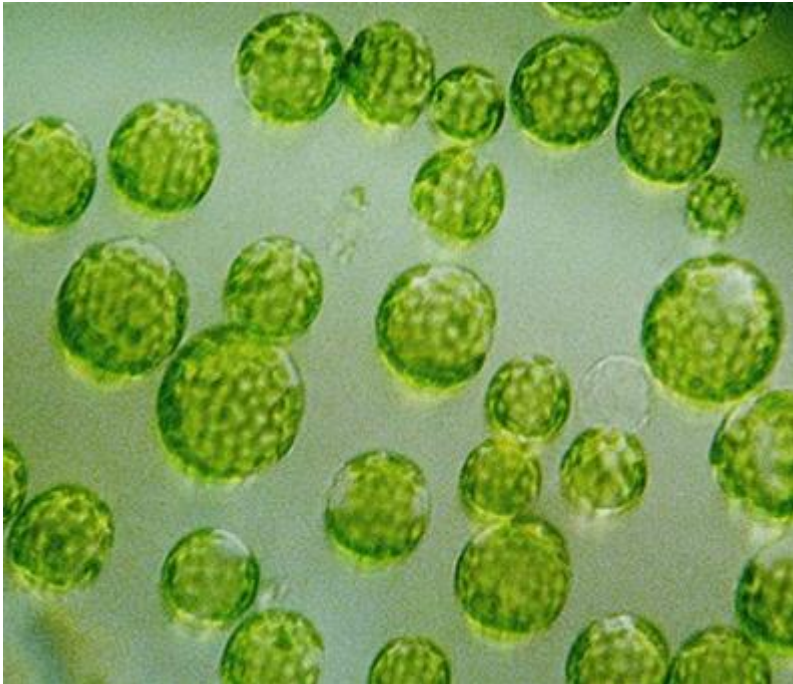
Pages 1234-1257 | Received 12 Feb 2018, Accepted 07 May 2018, Published online: 25 May 2018

 Download citation

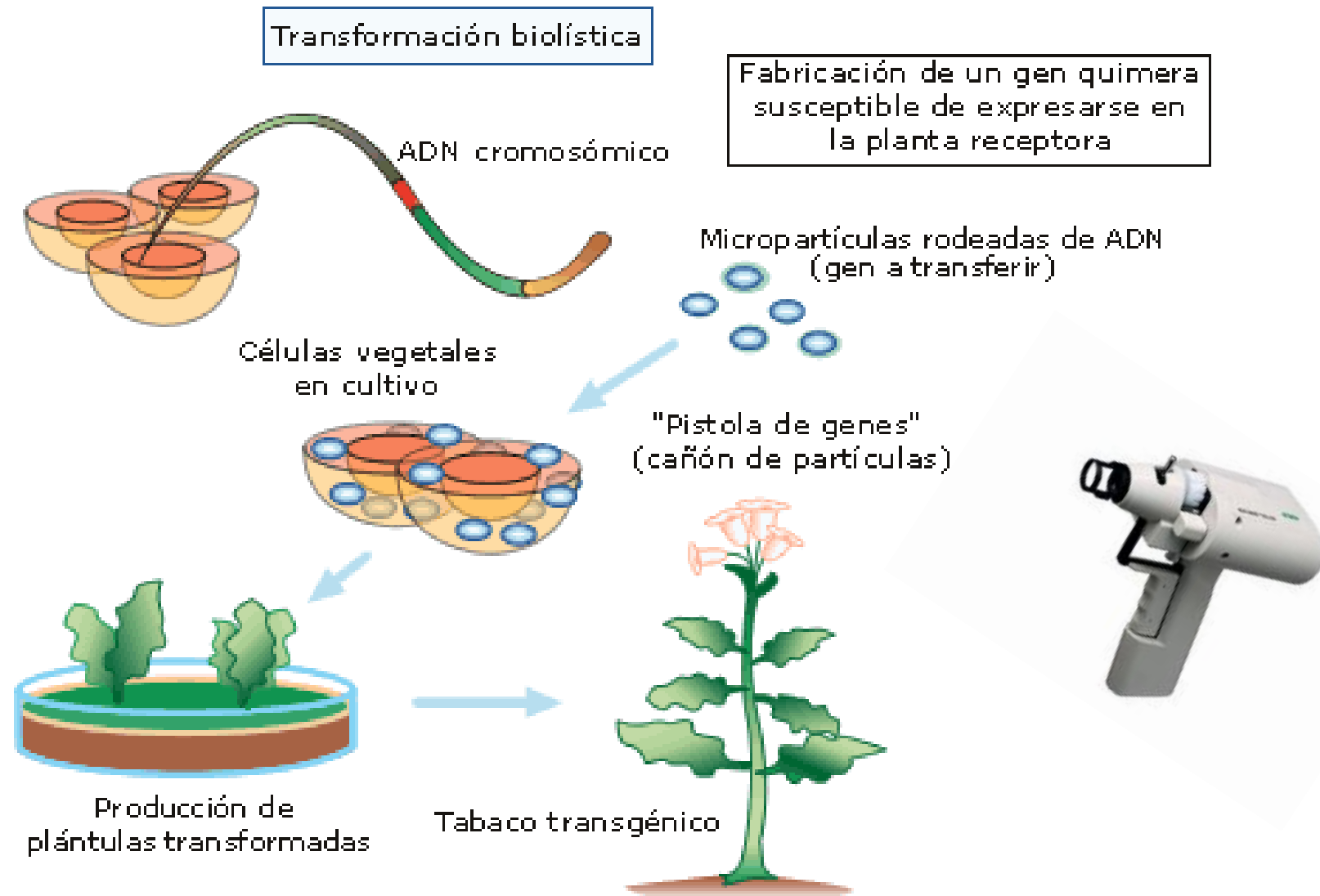
 <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1474964>



## Electroporación en protoplastos



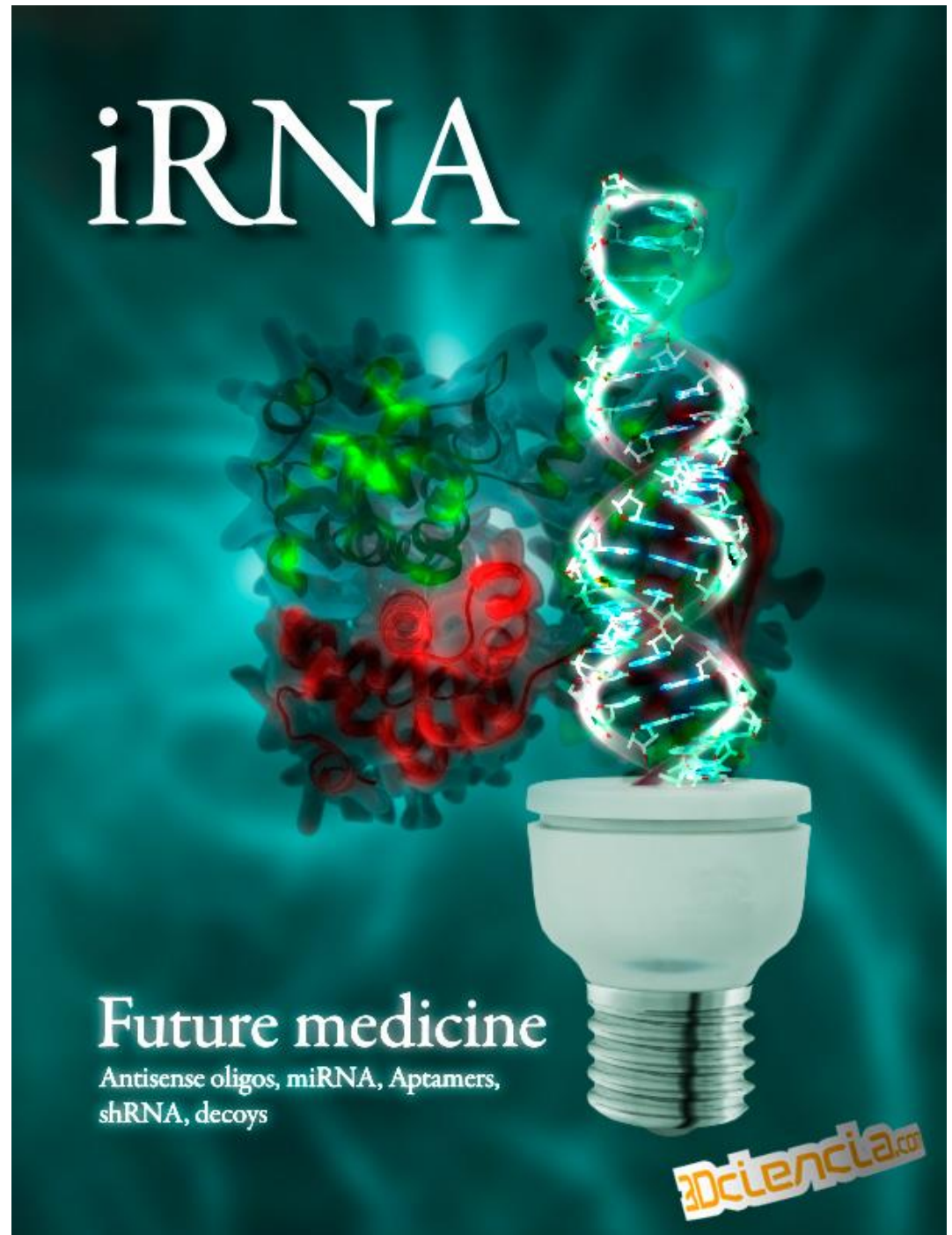
# Biobalística



## Microinyección



# Interferencia por ARN



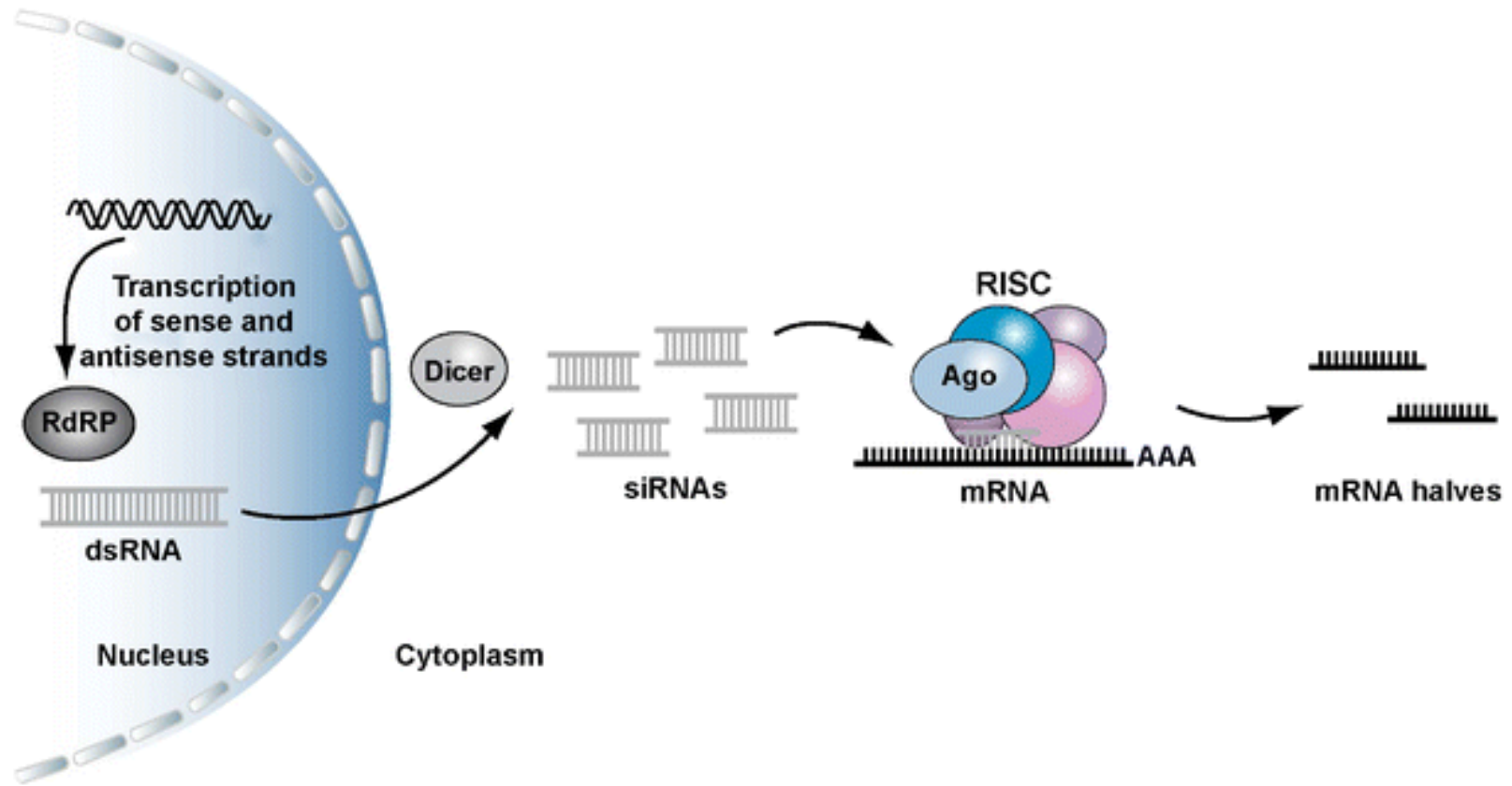


Fig. 2 Current model of the mechanism leading to RNA interference in eukaryotes, including filamentous fungi (for further explanation, see text). *dsRNA* double-stranded RNA, *RdRP* RNA-dependent RNA polymerase, *siRNA* small interfering RNA, *RISC* RNA-induced silencing complex



# Transgénesis

Adición de genes de cualquier especie para crear una nueva variedad con rasgos deseados.



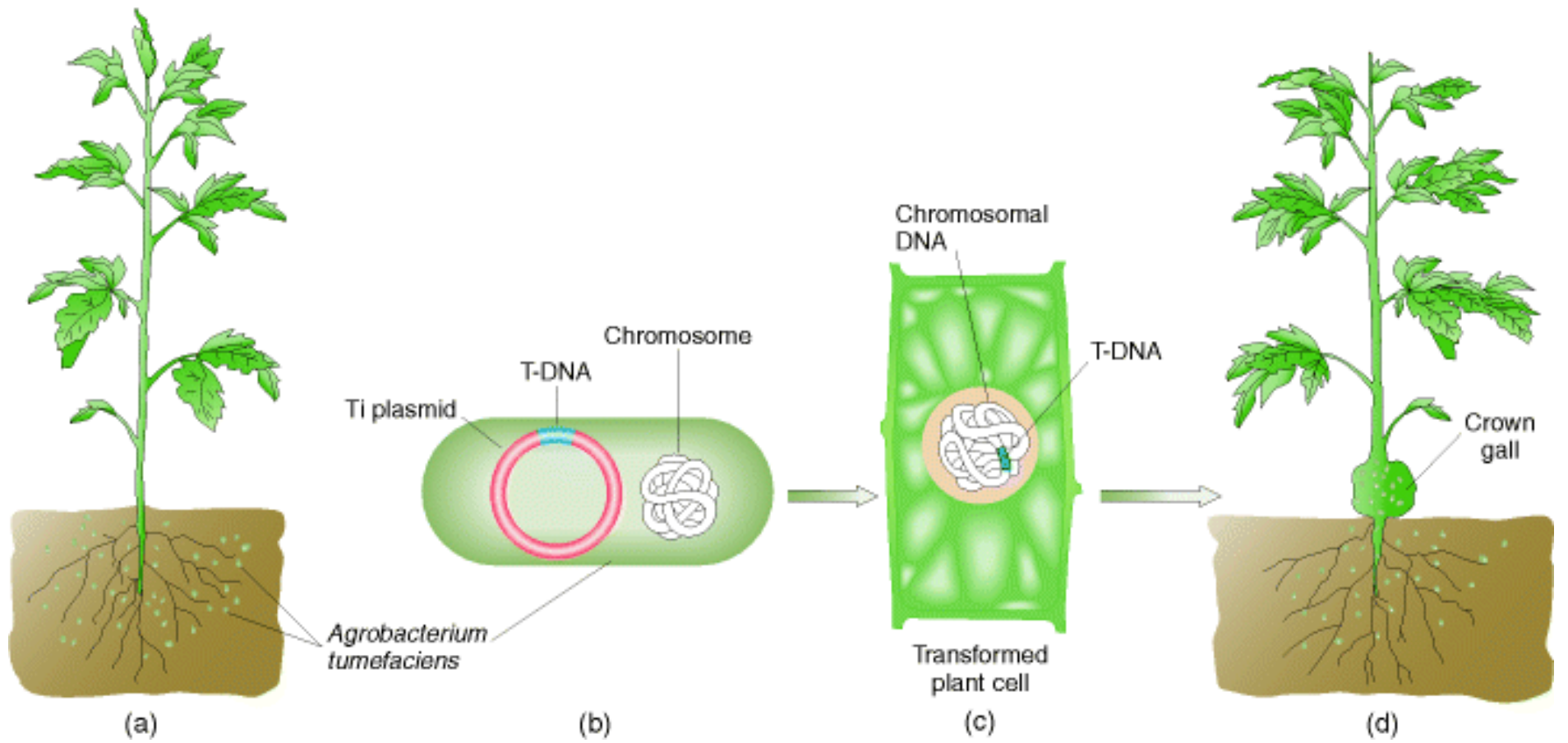
*La papaya Rainbow esta modificada con un gen que le otorga resistencia al virus de la mancha anillada.*

## Integración ectópica de ADN foráneo con especificidad media/baja:

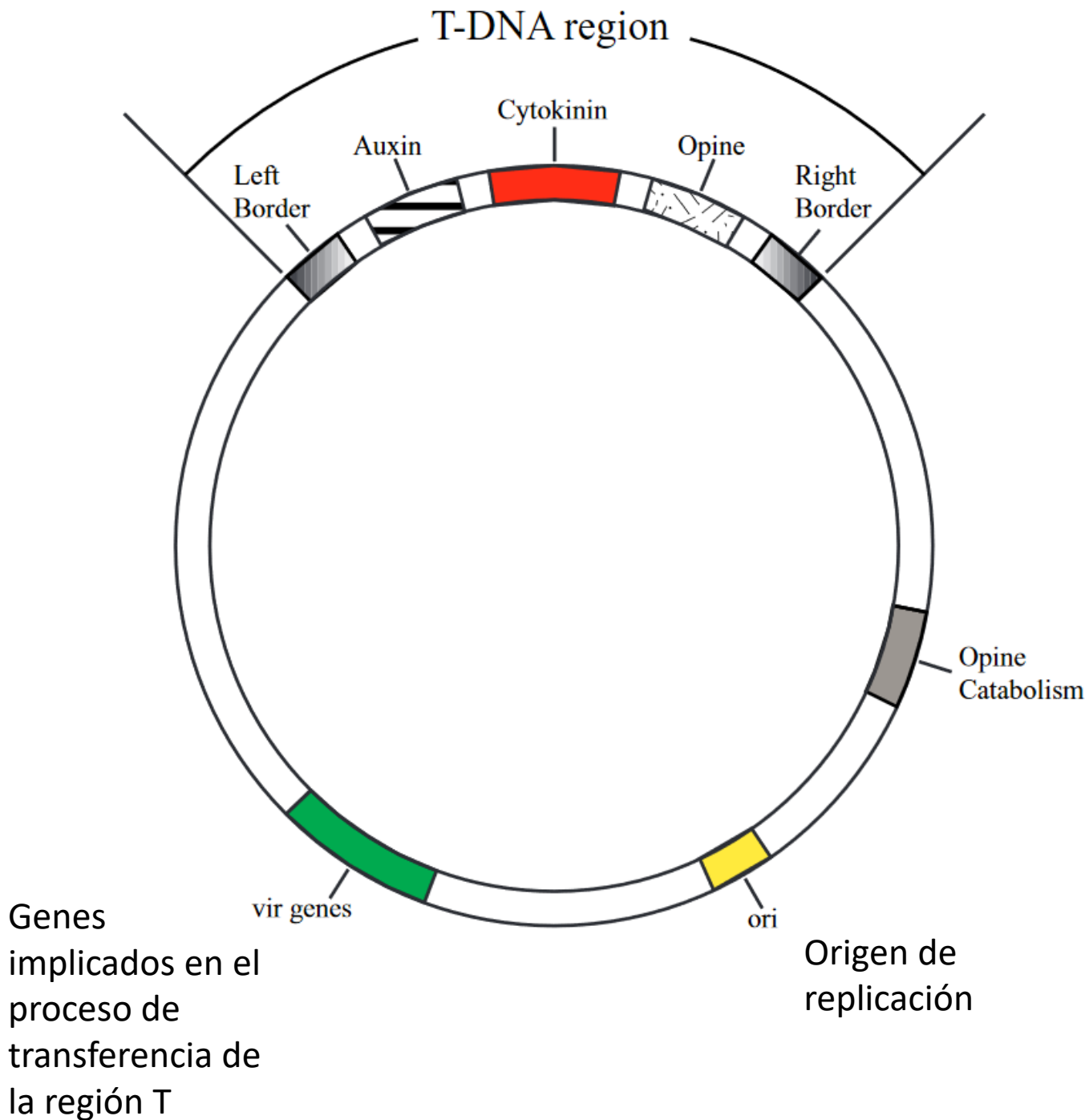
- **Plásmido Ti *Agrobacterium tumefaciens***: infección de esta bacteria (sólo en dicotiledóneas).
- Enzimas de restricción (**mutagénesis REMI**).
- Mediada por **transposones**: sistema Sleeping Beauty.
- Mediada por **recombinasas**: sistema Cre/LoxP.

# Modificación genética mediante infección con *Agrobacterium tumefaciens*



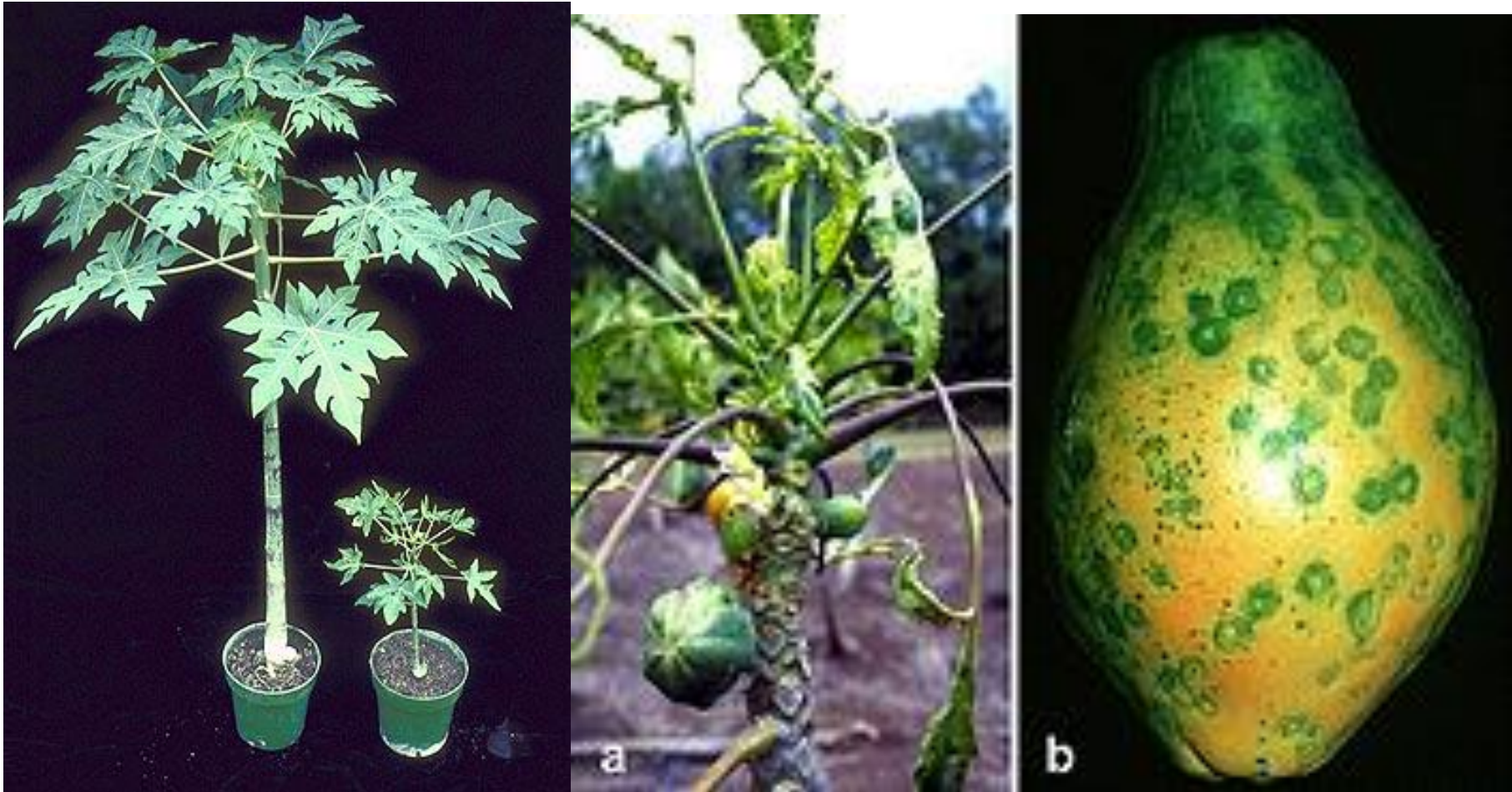


## Genes implicados en el proceso de infección



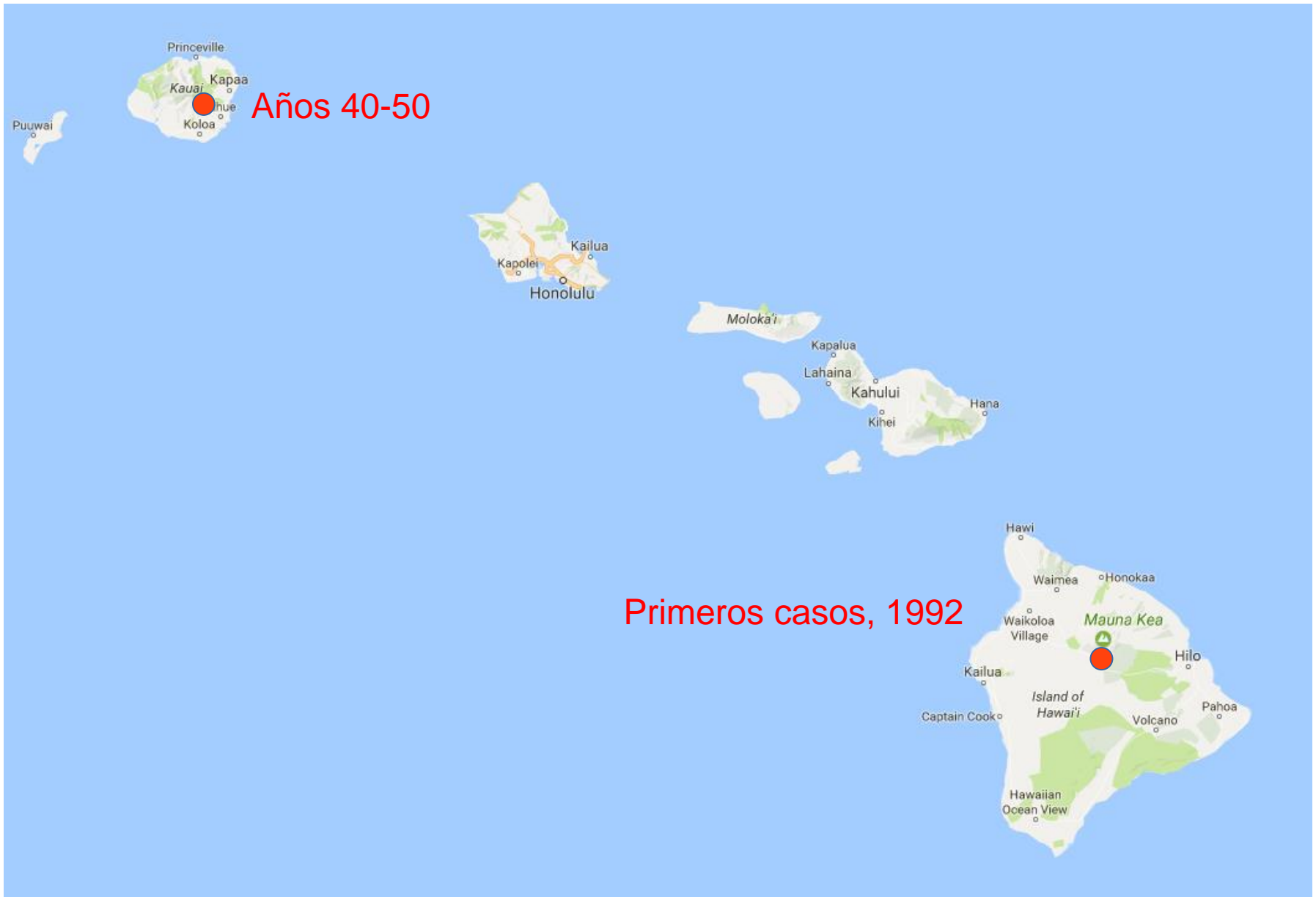
Integración inespecífica

# El caso de la papaya y el virus de la mancha anular



Gonsalves, D. (2004). Transgenic papaya in Hawaii and beyond. *AgBioForum*, 7(1&2), 36-40.

# El caso de la papaya y el virus de la mancha anular



- **(1970)** 2500 acres en Puna (95% producción).
- **(1986)** se aísla la secuencia de la cubierta del PRSV.
- **(1988)** primeros experimentos de transformación embriogénica mediante biobalística.

Se obtienen **17 plantas transformadas** que se propagan y testan utilizando una cepa muy agresiva del virus.

- **(1991)** se identifica la **línea 55-1 ('Sunset')**, resistente al virus en experimentos en invernadero.
- **(1992)** experimentos de campo (comportamiento agronómico + resistencia).

Un mes más tarde se da el **primer caso de PRSV en el distrito de Puna.**

## **Stable transformation of papaya via microprojectile bombardment**

**Maureen M. M. Fitch<sup>1</sup>, Richard M. Manshardt<sup>1</sup>, Dennis Gonsalves<sup>2</sup>, Jerry L. Slightom<sup>3</sup>, and John C. Sanford<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Department of Horticulture, University of Hawaii, Honolulu, HI 96822, USA

<sup>2</sup> Department of Plant Pathology, Cornell University, Geneva, NY 14456, USA

<sup>3</sup> The Upjohn Company, Kalamazoo, MI 49001, USA

<sup>4</sup> Department of Horticultural Sciences, Cornell University, Geneva, NY 14456, USA



## Variedades transgénicas de papaya:



Variedad '**SunUp**'  
homocigótica para  
el transgén.



x



Variedad '**Rainbow**'  
cruzamiento entre la  
variedad transgénica  
'SunUp' y la no transgénica  
'Kapoho'.

-(1992) A finales de año, todas las plantas no transgénicas estaban ya infectadas, mientras que las transgénicas mostraban resistencia.

-(1994) la plaga se vuelve incontrolable y el sector se atraviesa una grave crisis.

-(1995) experimentos de campo extensivos con 'Rainbow' y algunas 'SunUp'.



Papaya orchard infected with PRSV



-(1995-1997) periodo de regularización (*US Environmental Protection Agency* y la *US Food and Drug Administration*).

- (1998) licencia para comercializarla y distribución gratuita de semillas (principalmente 'Rainbow') a los productores.

-(1999) recolección de las primeras cosechas.

-(2000's) introducción y desarrollo de variedades transgénicas de papaya adaptadas a las condiciones locales en **Brasil, Venezuela, Tailandia, Jamaica, Tanzania, Bangladesh y Uganda.**

-(2008) el genoma de la papaya es secuenciado (primer genoma vegetal transgénico secuenciado).



# **Efficient transformation of papaya by coat protein gene of papaya ringspot virus mediated by *Agrobacterium* following liquid-phase wounding of embryogenic tissues with caborundum**

Ying-Huey Cheng<sup>1</sup>, Jiu-Sherng Yang<sup>2</sup>, and Shyi-Dong Yeh<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Plant Pathology, National Chung-Hsing University, Taichung City, Taiwan, R. O. C.

<sup>2</sup> Department of Botany, National Chung-Hsing University, Taichung City, Taiwan, R. O. C.

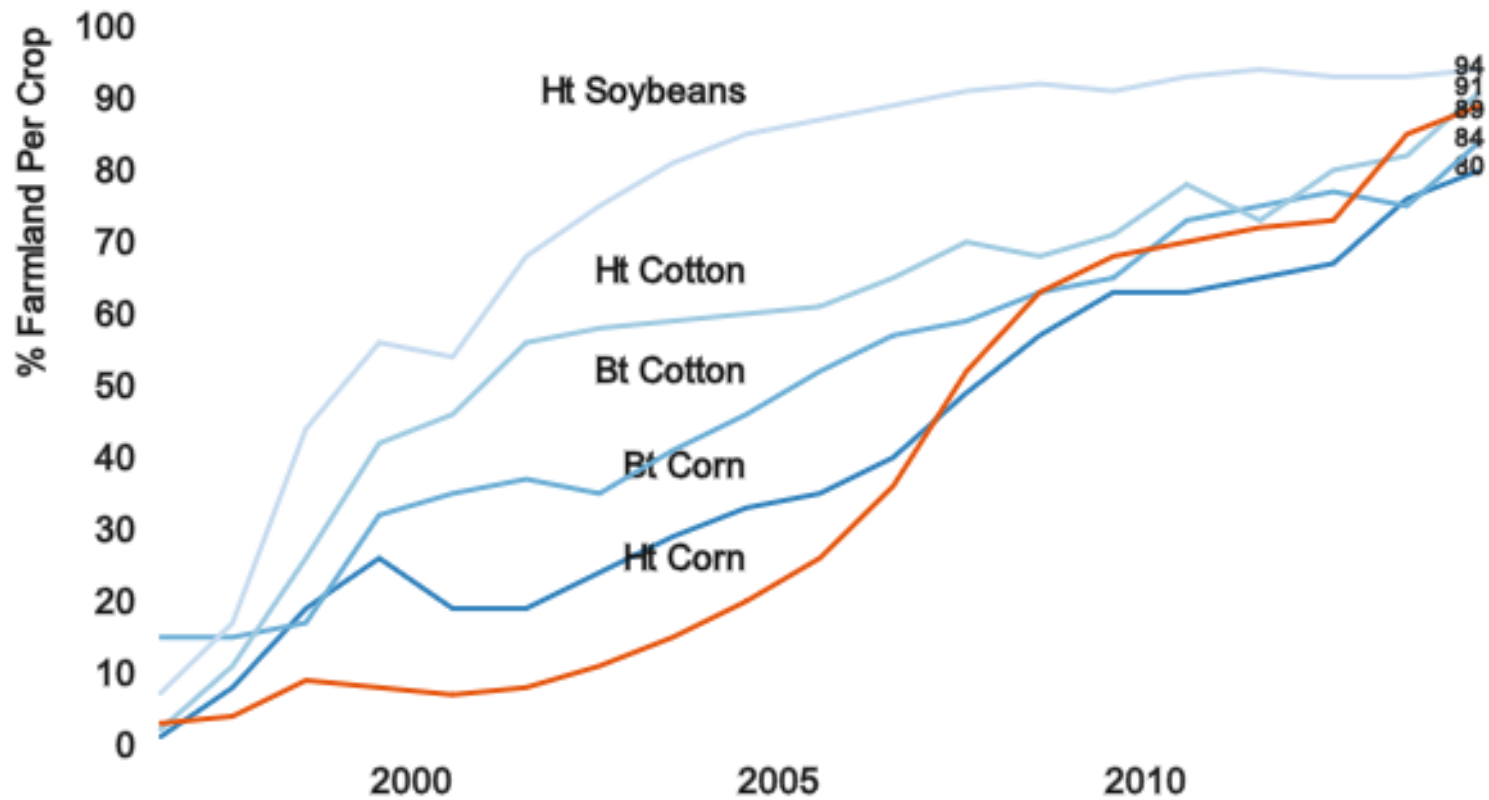
Received 7 February 1996/Revised version received 11 April 1996 – Communicated by I. K. Vasil

G. Chen · C.M. Ye · J.C. Huang · M. Yu · B.J. Li

# **Cloning of the papaya ringspot virus (PRSV) replicase gene and generation of PRSV-resistant papayas through the introduction of the PRSV replicase gene**

Received: 23 August 2000 / Revision received: 16 November 2000 / Accepted: 21 November 2000 / Published online: 16 February 2001  
© Springer-Verlag 2001

## Adoption of GMO Crops in the US, 1996-2014



**Ht:** Herbicide-tolerant **Bt:** Insect-resistant  
Source: [USDA Economic Research Service](#)

-Resistencia de la planta a **patógenos** (o a herbicidas).



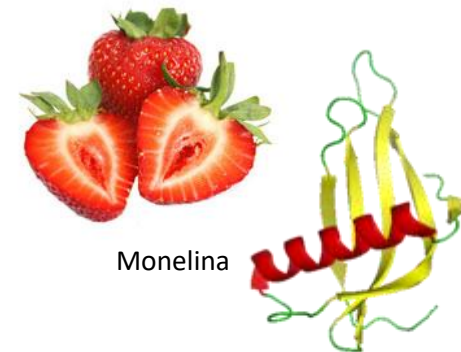
-Producción de **vacunas** contra gran número de enfermedades.

-Producción de **plásticos biodegradables**.



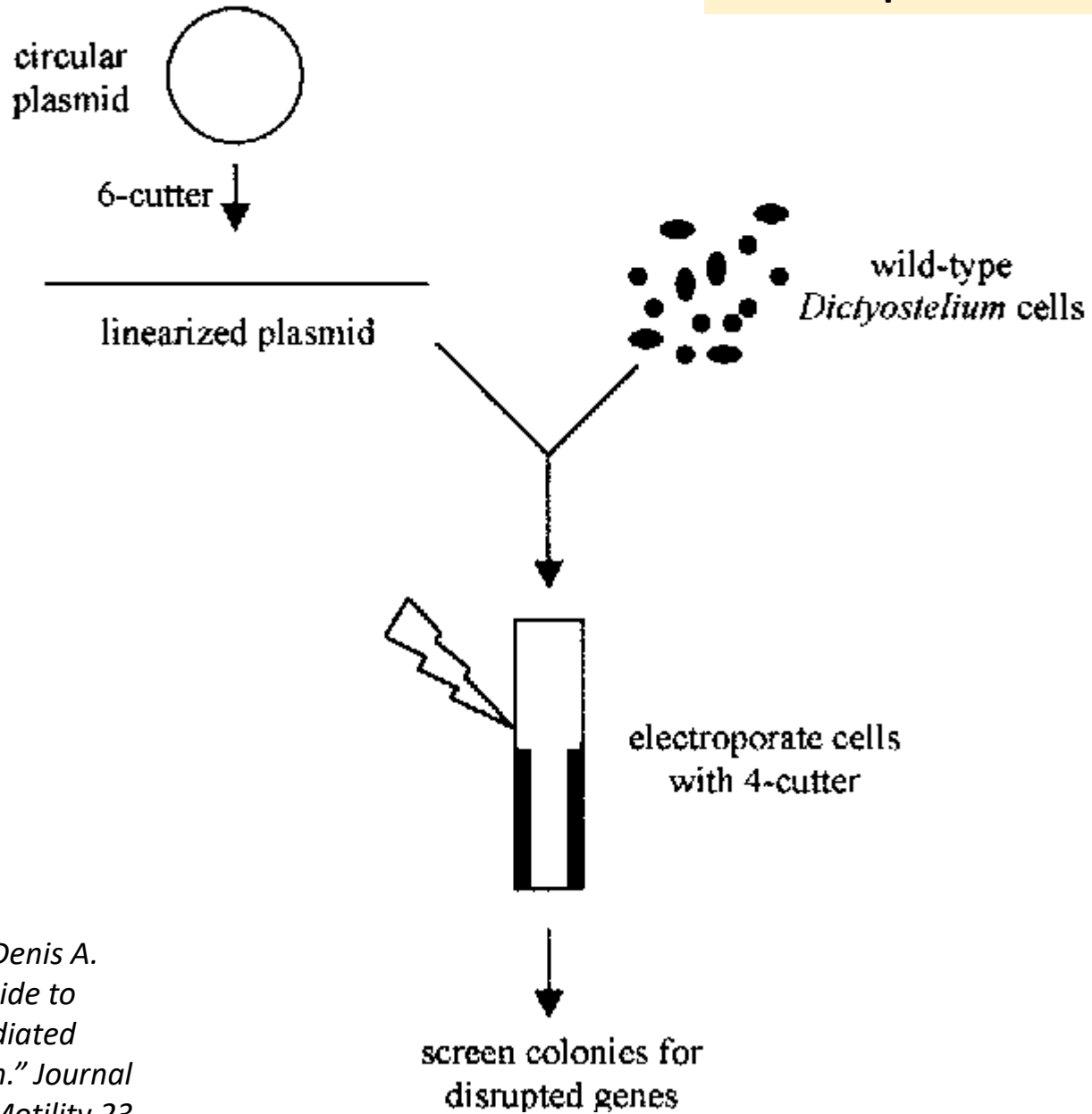
-Mejora de las **propiedades organolépticas** del producto.

-Producción de **anticuerpos monoclonales**.



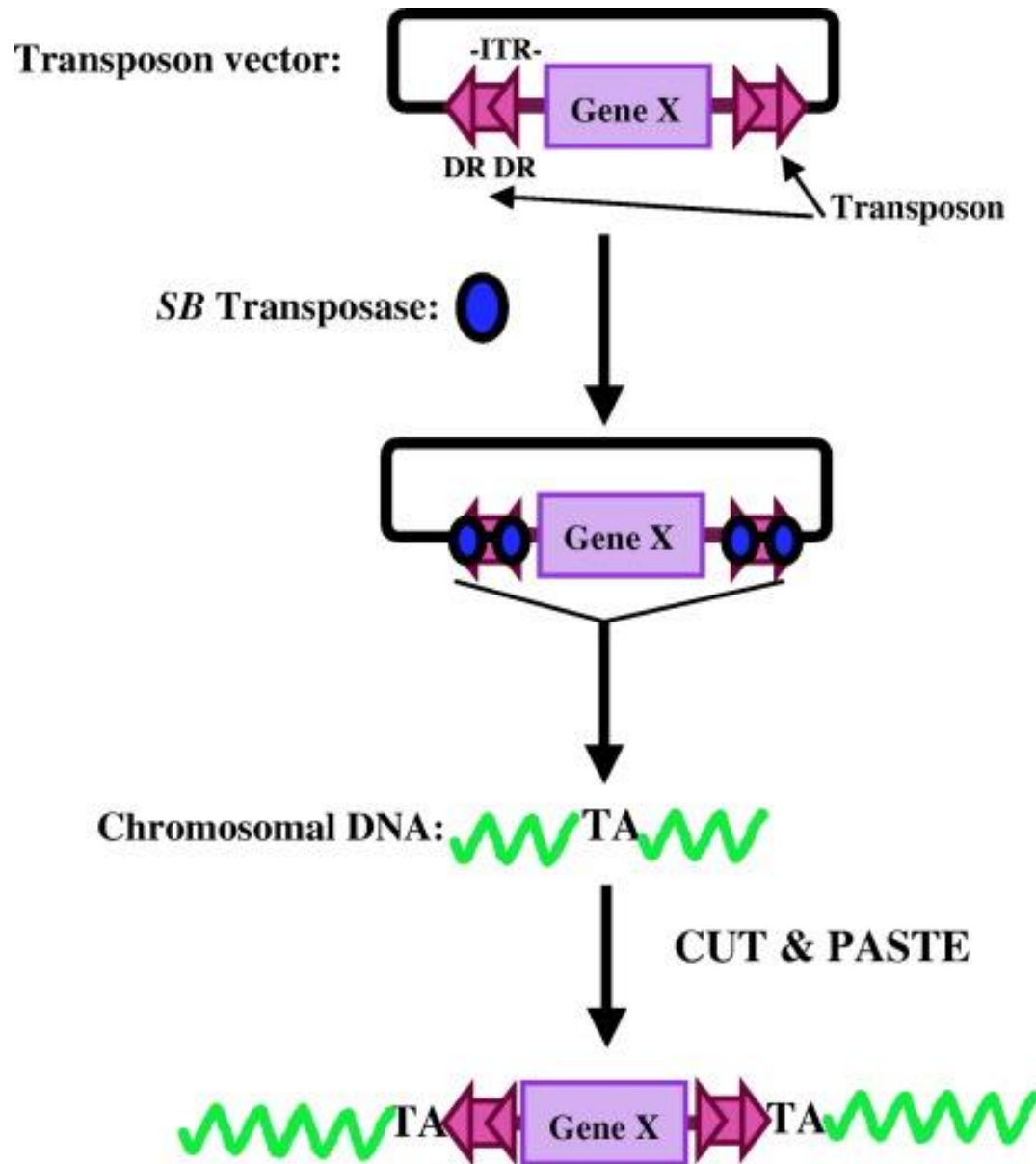
# REMI Mutagenesis

Integración específica mediada por restrictasas



Guerin, Nicholas A. and Denis A. Larochelle. "A user's guide to restriction enzyme-mediated integration in Dictyostelium." *Journal of Muscle Research & Cell Motility* 23 (2002): 597-604.

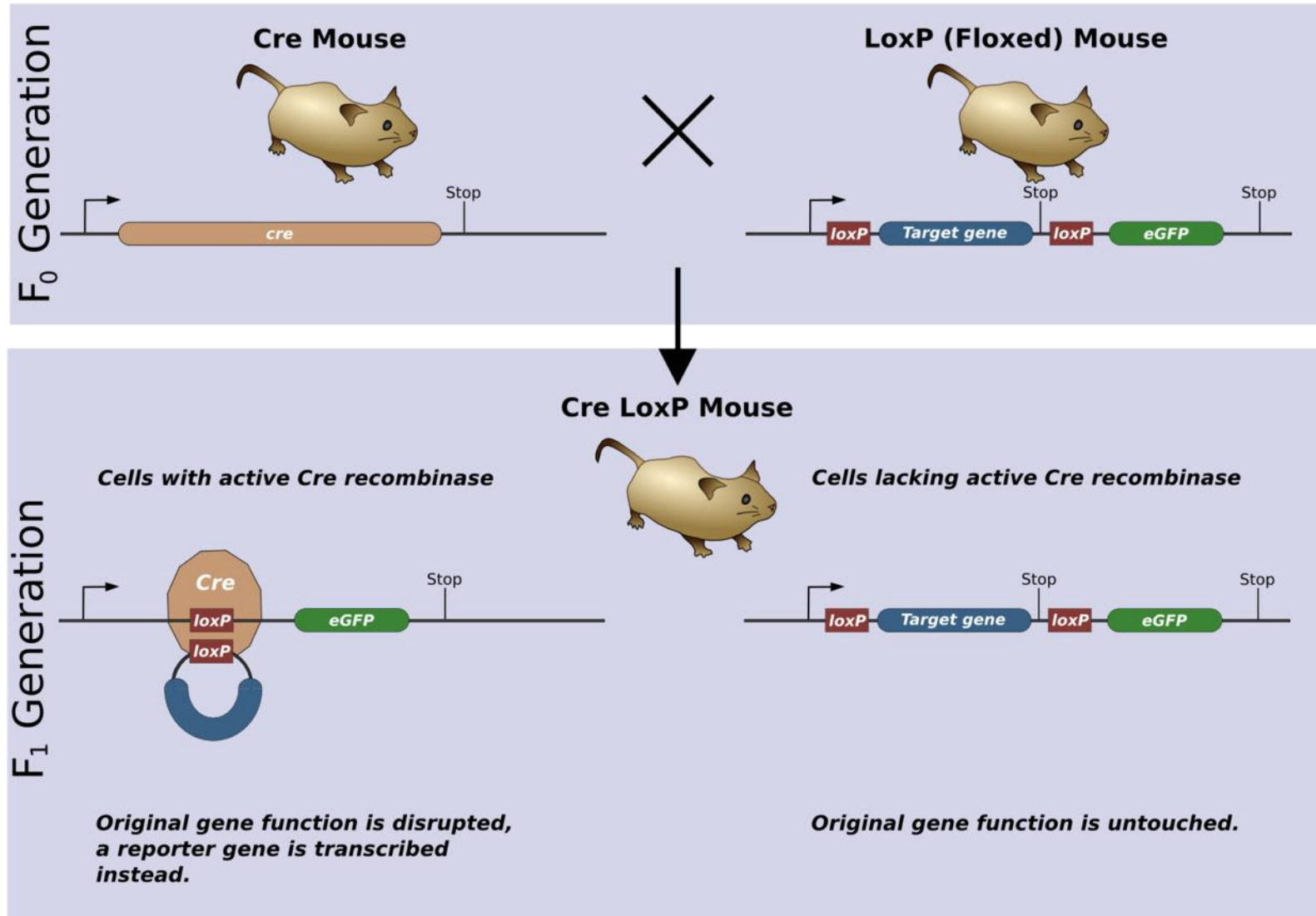
**Mutagénesis mediada por transposones (Sleeping Beauty)**



Geurts et al. (2003). Gene transfer into genomes of human cells by the sleeping beauty transposon system. *Molecular Therapy*, 8(1):108-117.



## Integración específica mediada por recombinasas

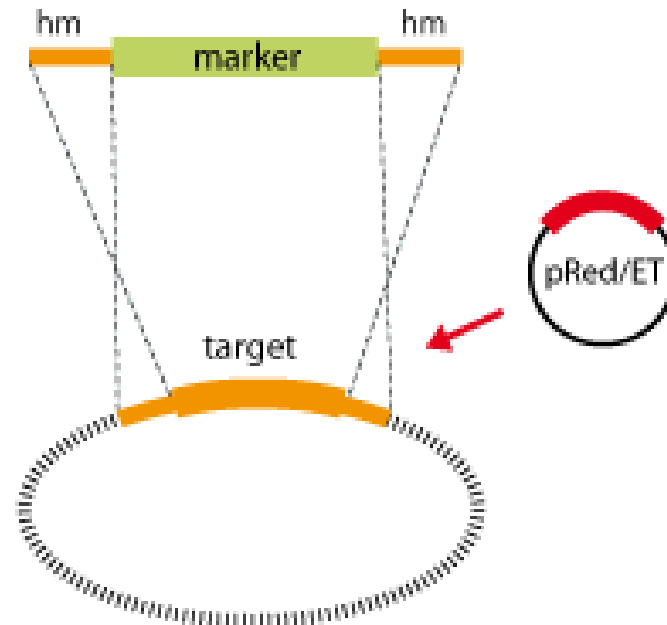


# “Gene targeting” o recombinación homóloga

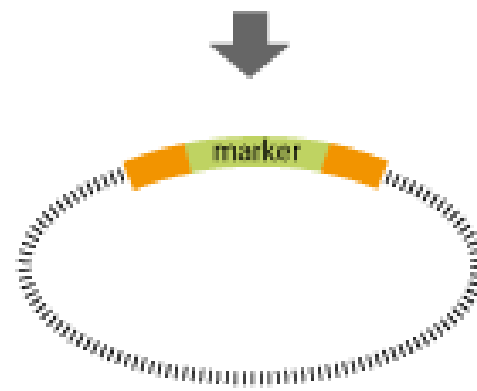
targeting construct



target vector / chromosome



modified target



**Efecto ‘insercional’:** posible interrupción de secuencias codificantes (productos proteicos no funcionales, intensificación de la actividad de ciertos genes).

**Efecto posicional:** función alterada del gen insertado en función de la posición que ocupa del genoma (hipermetilación, condensación del ADN,...).

## Principal inconveniente:

La técnica depende, en general, de la rara **preexistencia de sitios de reconocimiento** en el genoma de interés o en la generación en el mismo de sitios específicos, en muchas ocasiones usando metodologías complicadas y poco efectivas.

# Edición génica

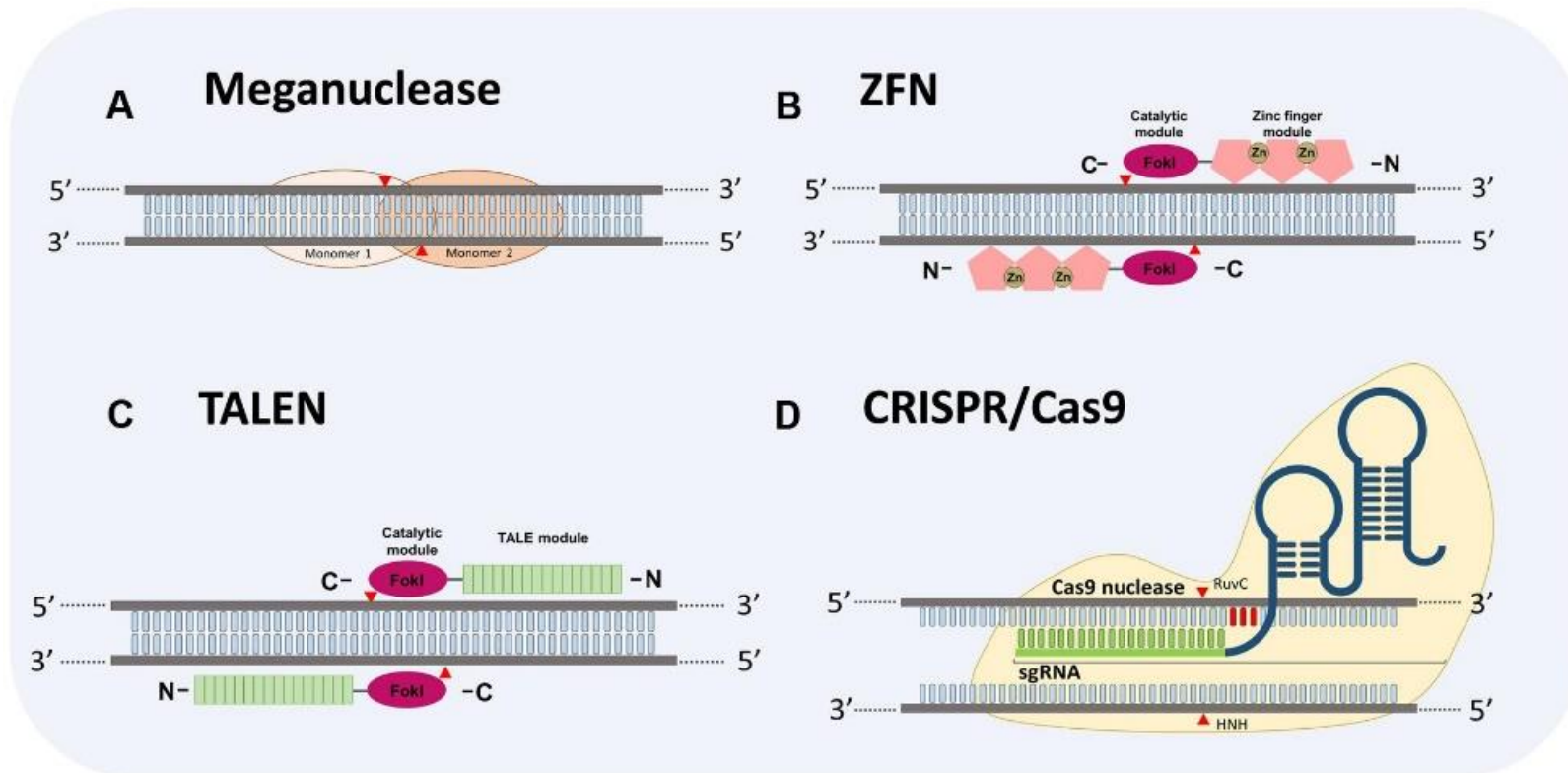
Uso de un sistema enzimático para modificar el ADN directamente dentro de la célula.

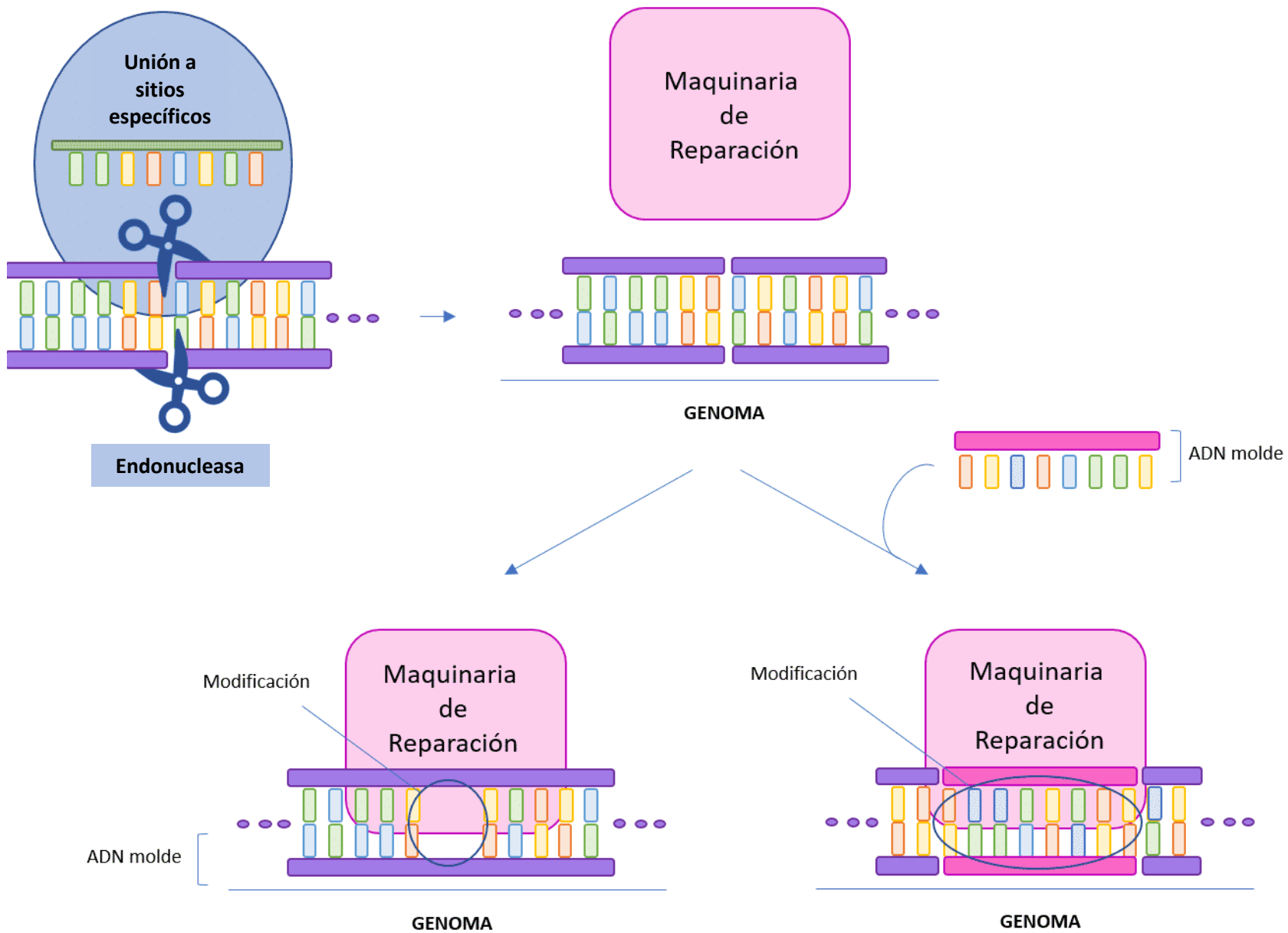


*La edición génica fue usada para desarrollar una canola tolerante a herbicida para ayudar a los agricultores a controlar las malezas.*

# Integración ectópica de ADN foráneo con especificidad alta:

- Meganucleasas: sistemas I-CreI y I-SceI
- Dedos de zinc (ZFNS o ZN)
- TALEN
- CRISPR-Cas9





## Mecanismos de reparación del ADN

### Mutaciones puntuales:

- Reparación por **eliminación de bases**: base dañada
- Reparación por **eliminación de nucleótidos**: rayos UV
- Corrección de **emparejamiento erróneo**: mal emparejamiento

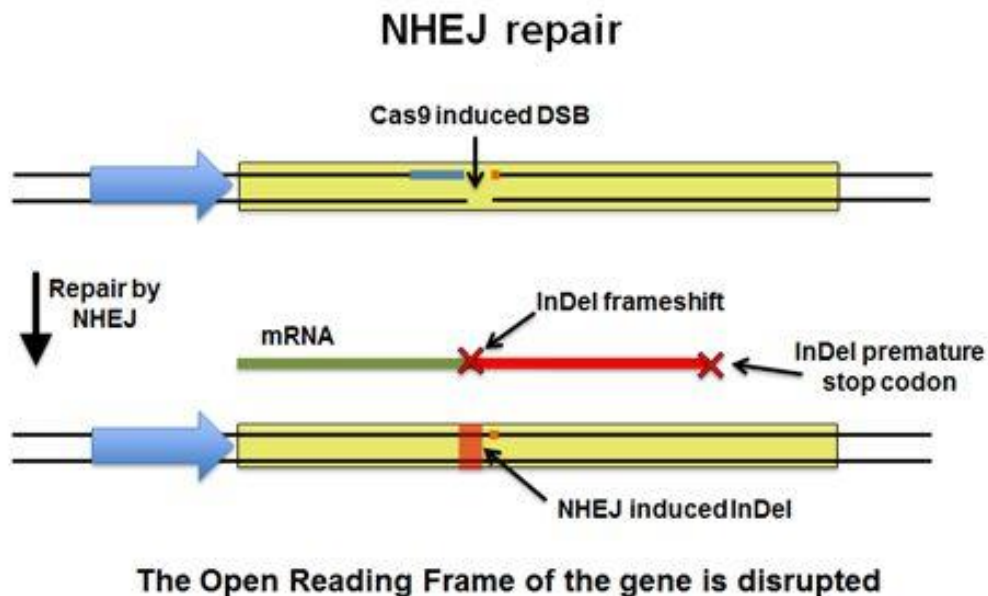
### Mutaciones de doble cadena:

- **Recombinación homóloga** (HR, homologous recombination)
- **Unión no homóloga** (NHEJ, non-homologous end-joining)



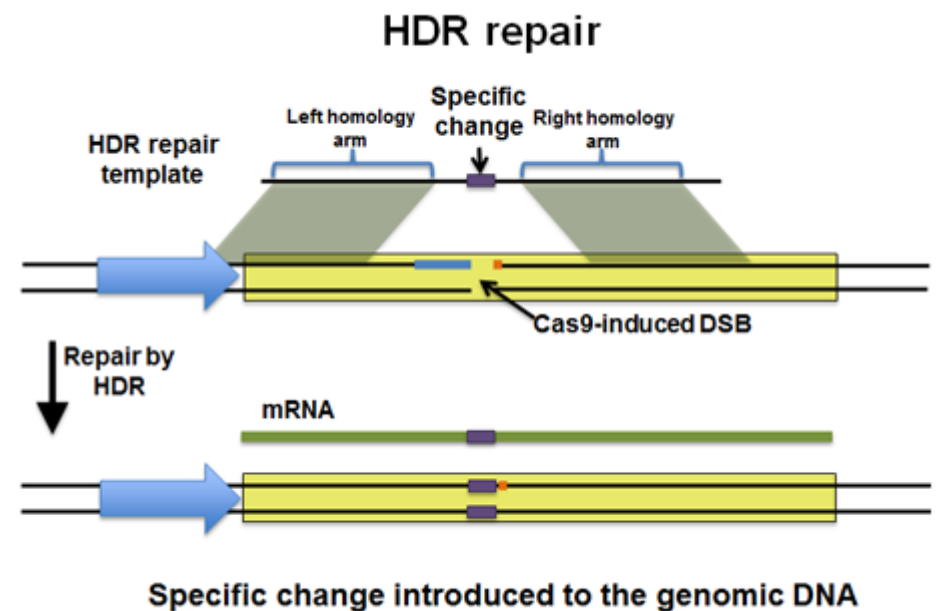
## Inserciones/deleciones (Knock outs)

**NHEJ:** (Non-homologous end joining)  
**Recombinación No Homóloga.** Los extremos de las dobles roturas se ligan sin la intervención de un ADN molde.

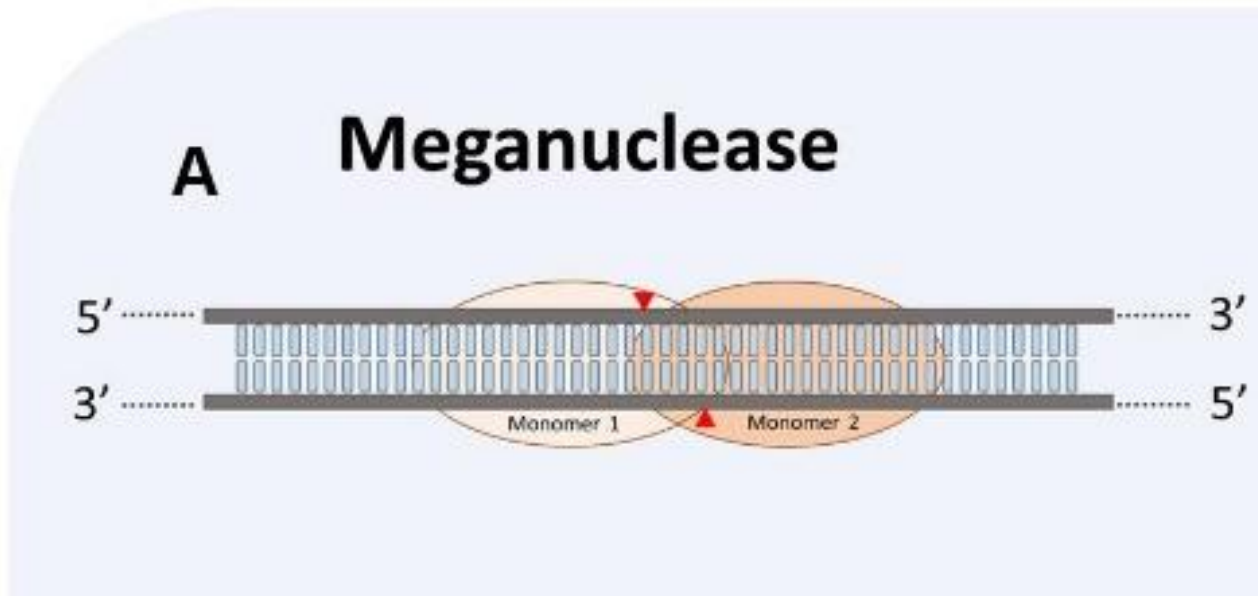


## Cambios Precisos en el ADN

**HDR:** (*Homology Directed Repair*) o  
**Recombinación Homóloga.** Las dobles roturas se reparan utilizando un ADN homólogo como molde.

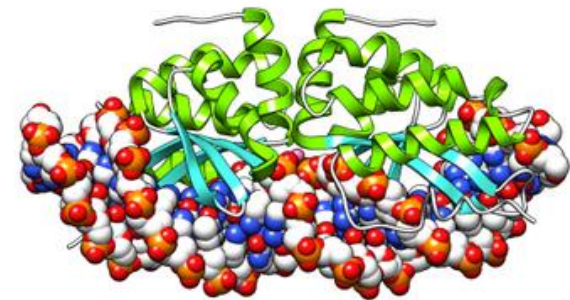


# Meganucleasas



Romay & Bragard.  
(2017). Antiviral  
Defenses in Plants  
through Genome  
Editing. *Front.  
Microbiol.*,  
[https://doi.org/10.3389  
/fmicb.2017.00047](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00047)

- Reconocimiento de sitios 12-40 pb
- No necesariamente palindr3micos
- Tolera alg3n error
- Cuatro familias



# Nucleasas de Dedos de Zinc, ZFNs (*Zinc finger nucleases*)



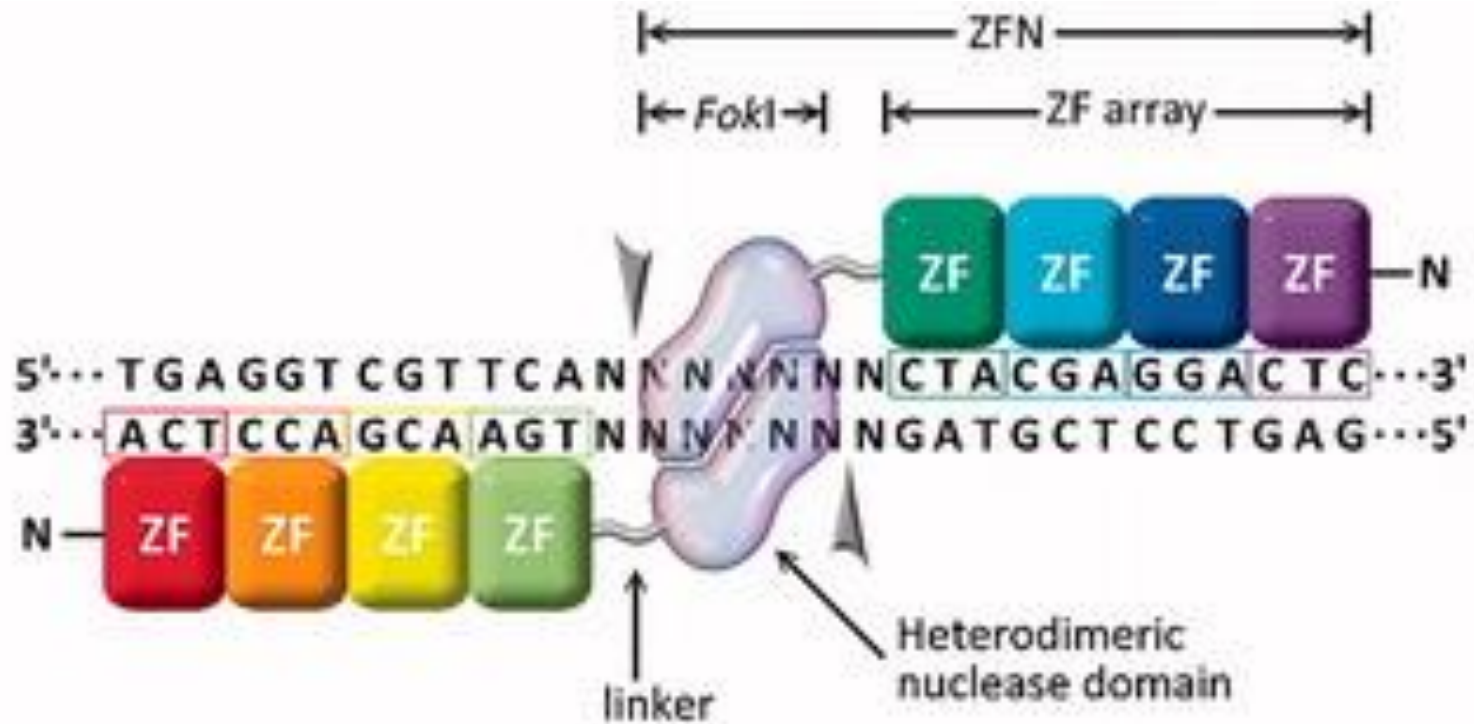
Dominio **Fok I** que produce **cortes** en la doble cadena de ADN

Dominio **ZFN** que reconoce sitios específicos de ADN a los que se une



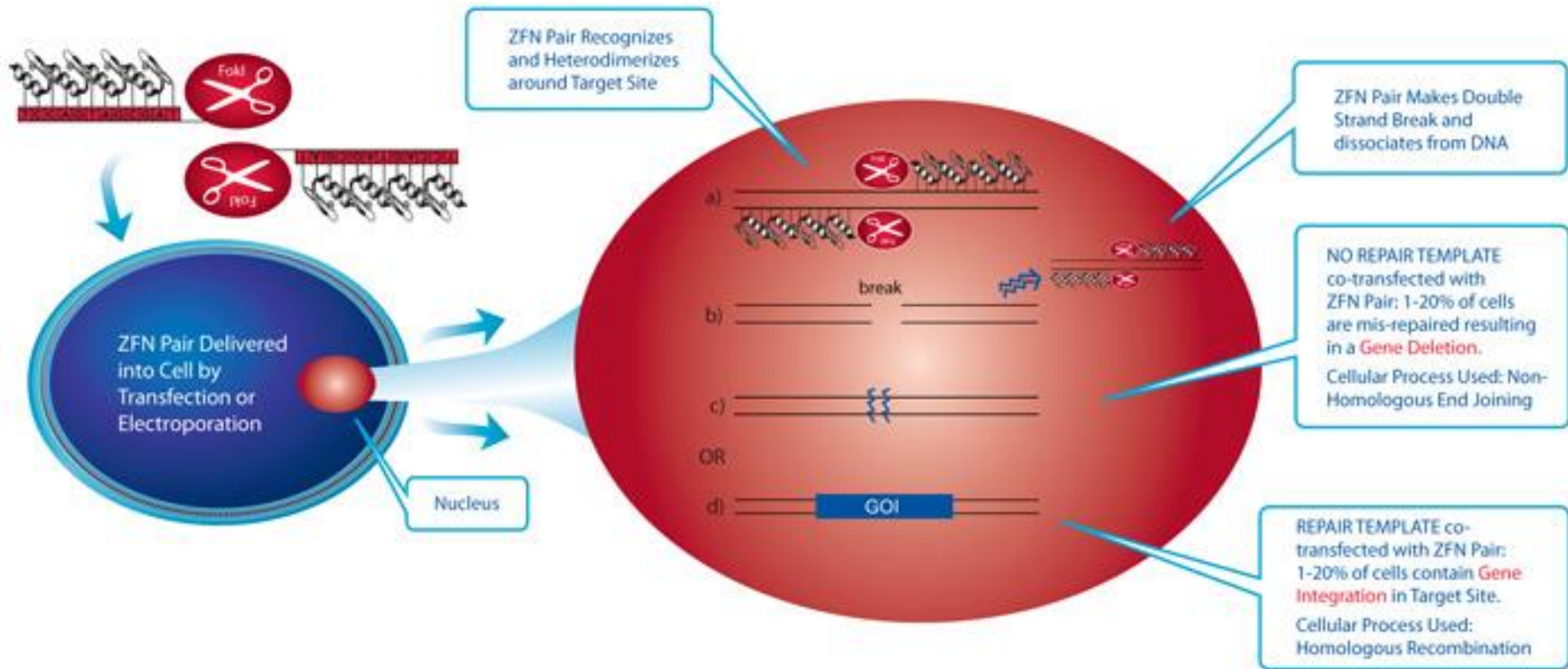
*Sitio de reconocimiento de 3 pb por cada dedo de zinc*

(A)



Lino et al. (2018). Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Deliv.*, 25(1):1234-1257.

# Delección de genes o edición genómica



# TALEN: transcription activator-like effectors nucleases

nature | **methods**

**2011**

Method of the Year

Genome Editing with  
Engineered Nucleases



**PROTOCOL**

## A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering

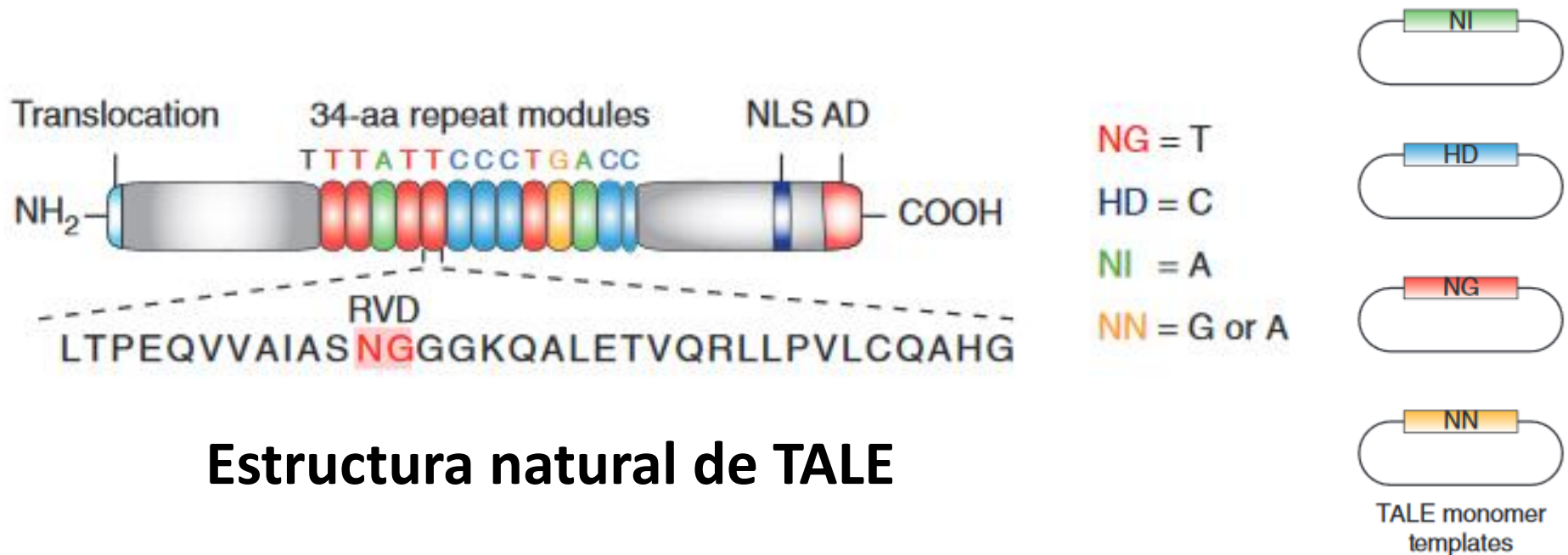
Neville E Sanjana<sup>1,2,4</sup>, Le Cong<sup>1-4</sup>, Yang Zhou<sup>1,2,4</sup>, Margaret M Cunniff<sup>1,2</sup>, Guoping Feng<sup>1,2</sup> & Feng Zhang<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Broad Institute of Massachusetts Institute of Technology and Harvard, Cambridge, Massachusetts, USA. <sup>2</sup>Department of Brain and Cognitive Sciences, McGovern Institute for Brain Research, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts, USA. <sup>3</sup>Program in Biological and Biomedical Sciences, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA. <sup>4</sup>These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to F.Z. (zhang\_f@mit.edu).

Published online 5 January 2012; doi:10.1038/nprot.2011.431

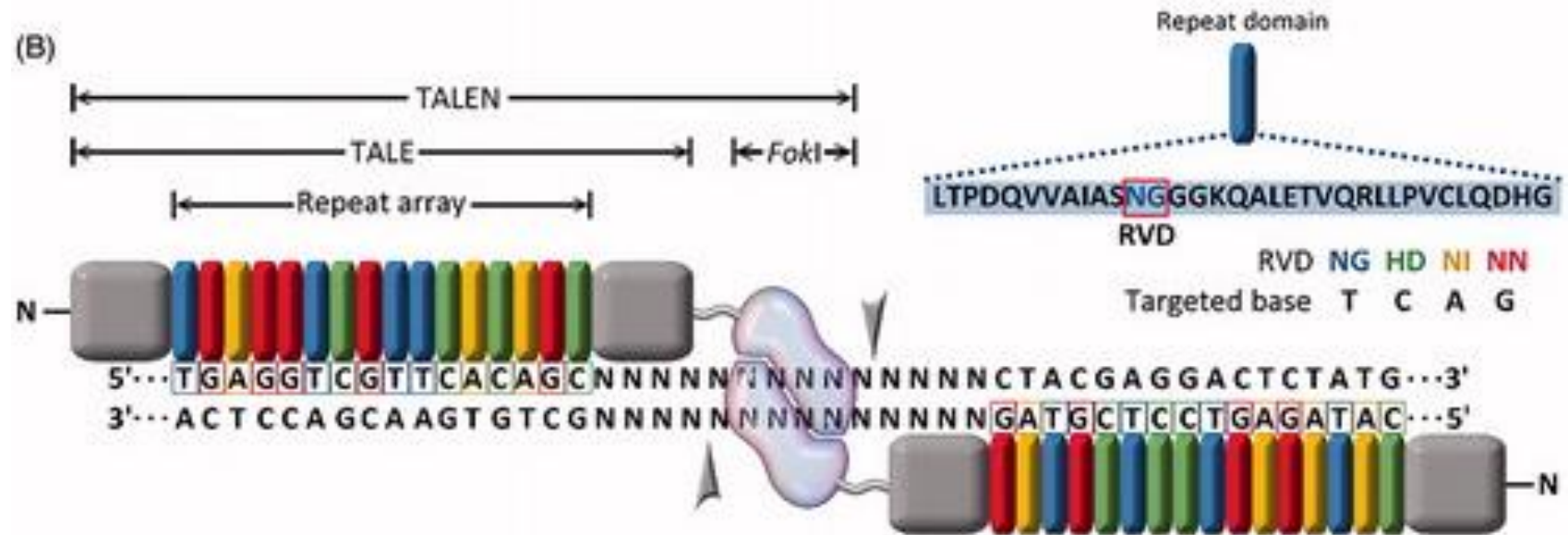
# TALEN: transcription activator-like effectors nucleases

- Descubrimiento asociado a *Xanthomonas*
- Factores de **unión específica a genes diana**, cuya expresión son capaces de regular. Esto facilita la infección bacteriana.



## Estructura natural de TALE

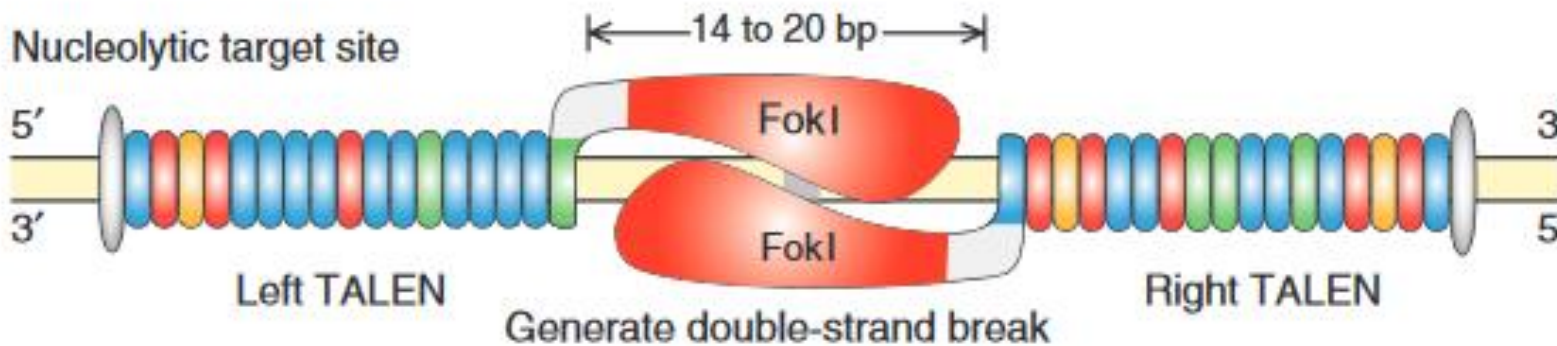
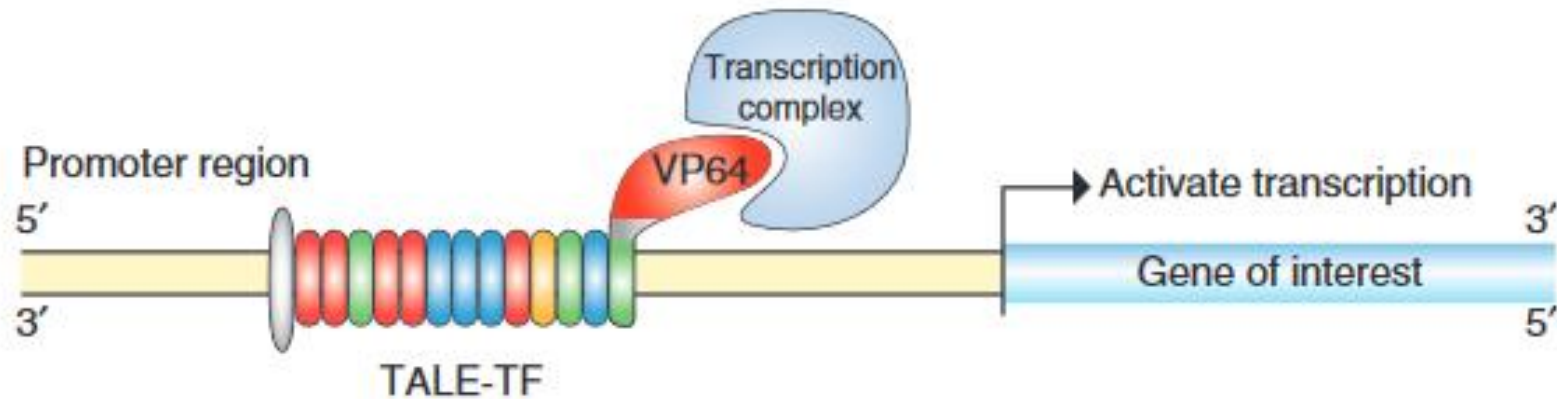
Código TALE



Lino et al. (2018). Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Deliv.*, 25(1):1234-1257.

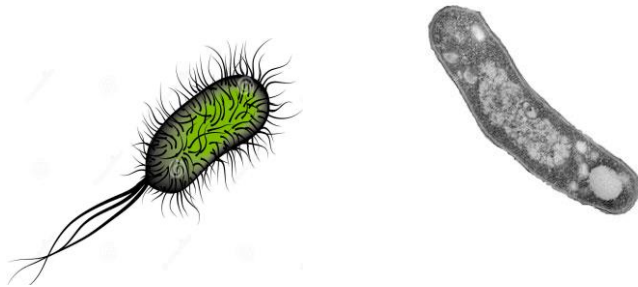


# Modulación de la transcripción o edición genómica



# SRSR, “Short Regularly Spaced Repeats”.

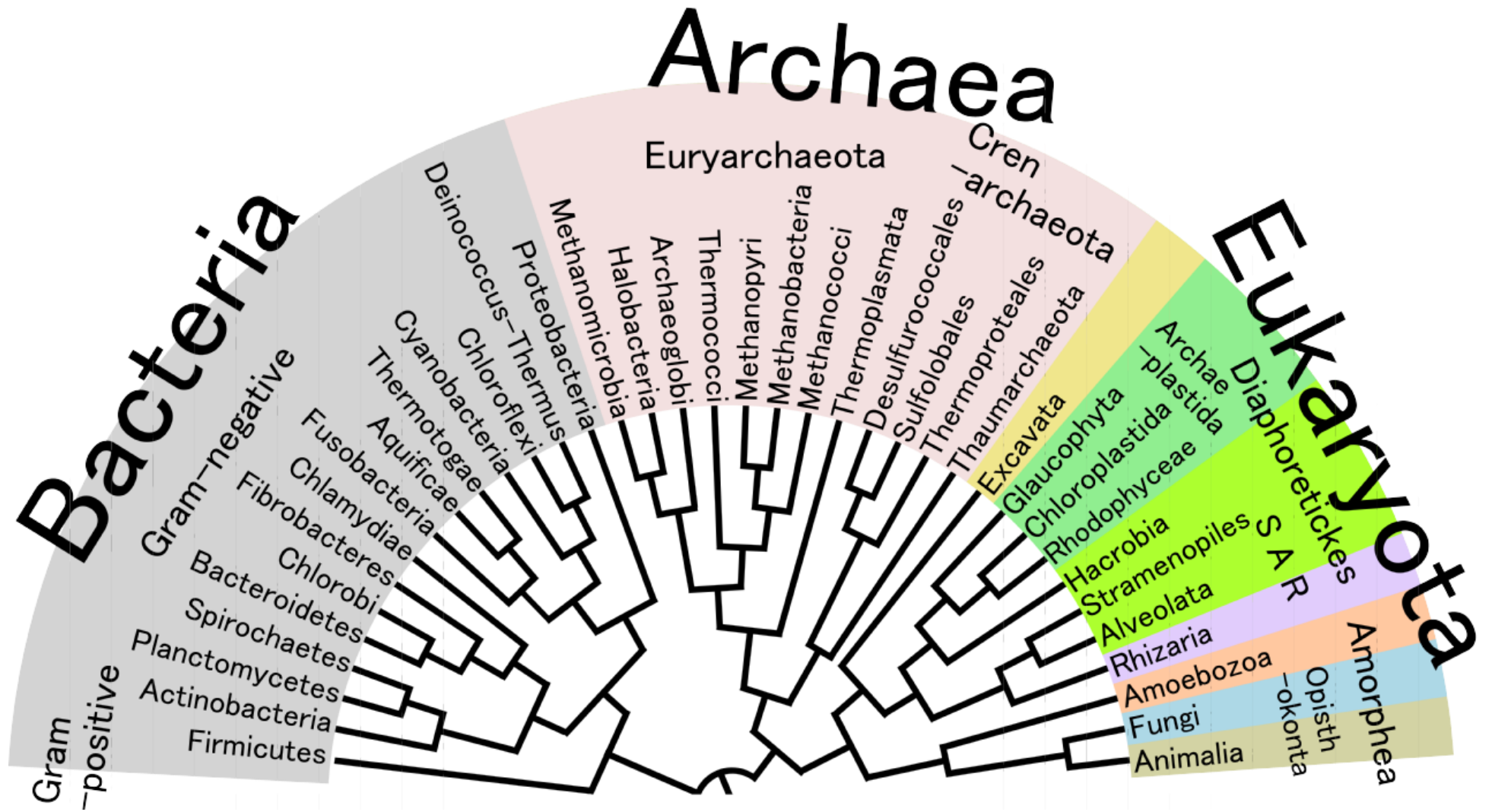
"Encontré unas secuencias repetidas en su genoma. Tenían que ser importantes para las células, porque muchas se morían cuando las manipulábamos [...] comprendí que debían cumplir una función importante para la célula"  
(Mojica)



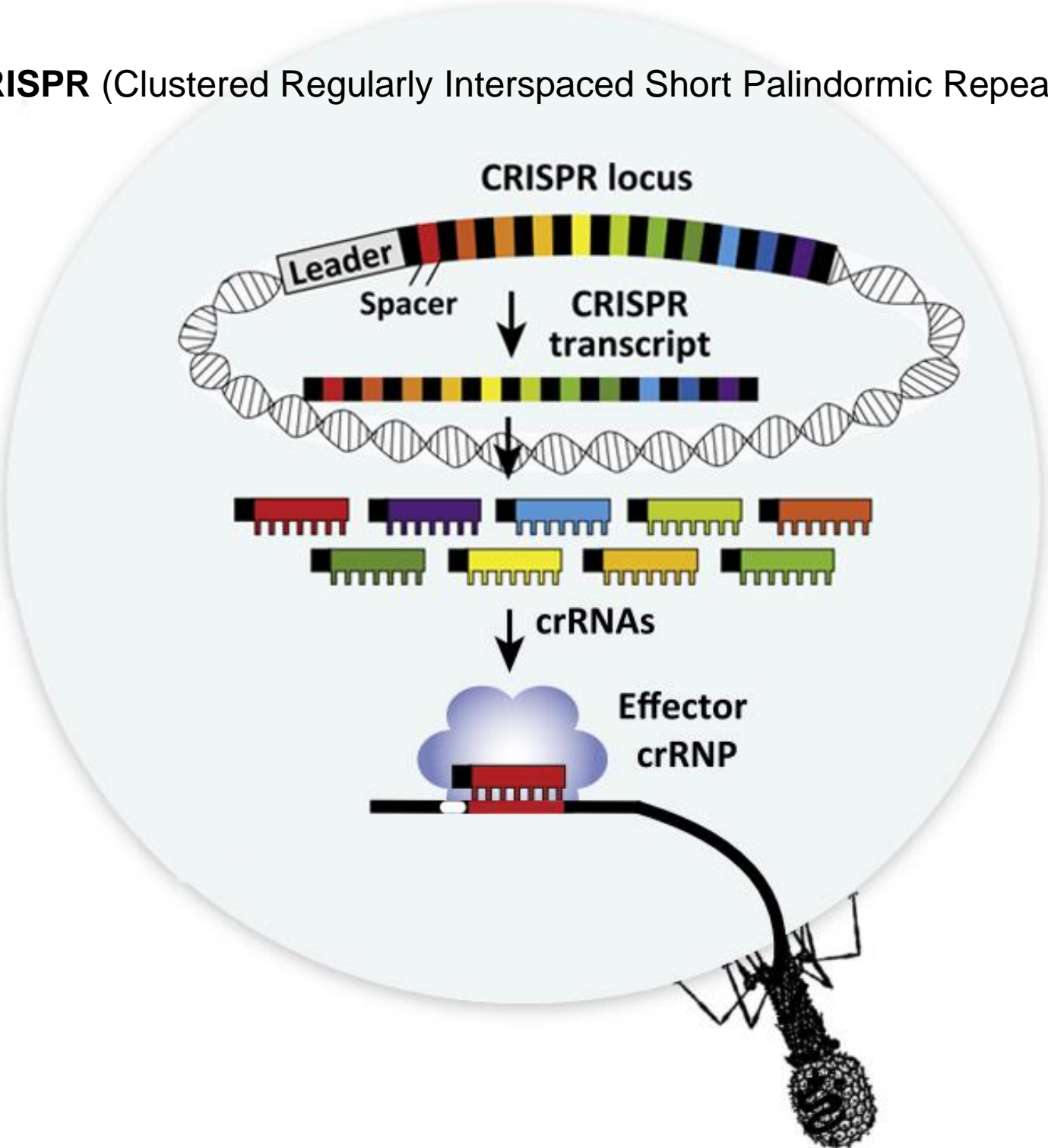
Posteriormente encontradas en *Escherichia coli* y *Mycobacterium tuberculosis*



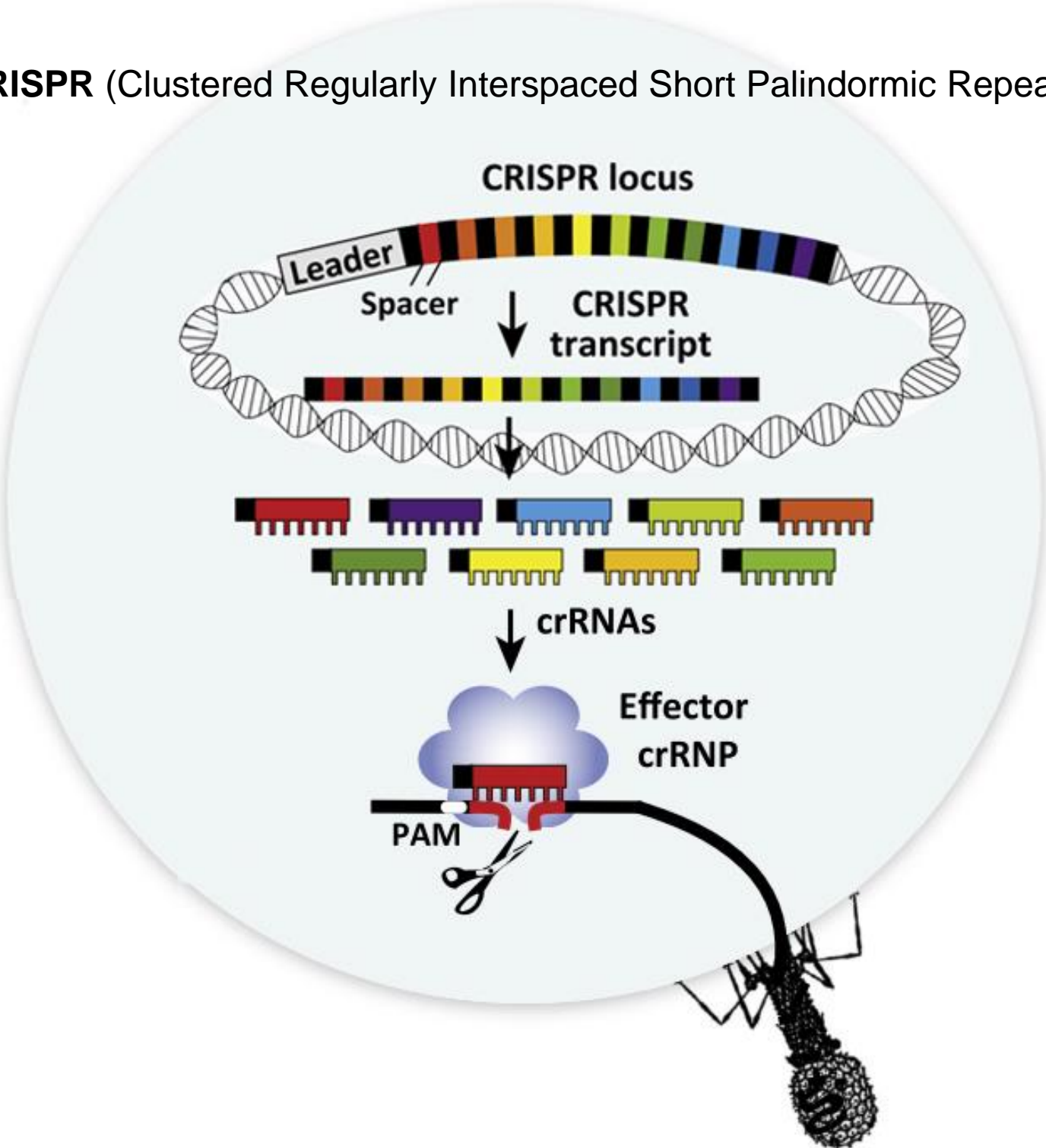
Arquea *Haloferax mediterranei*



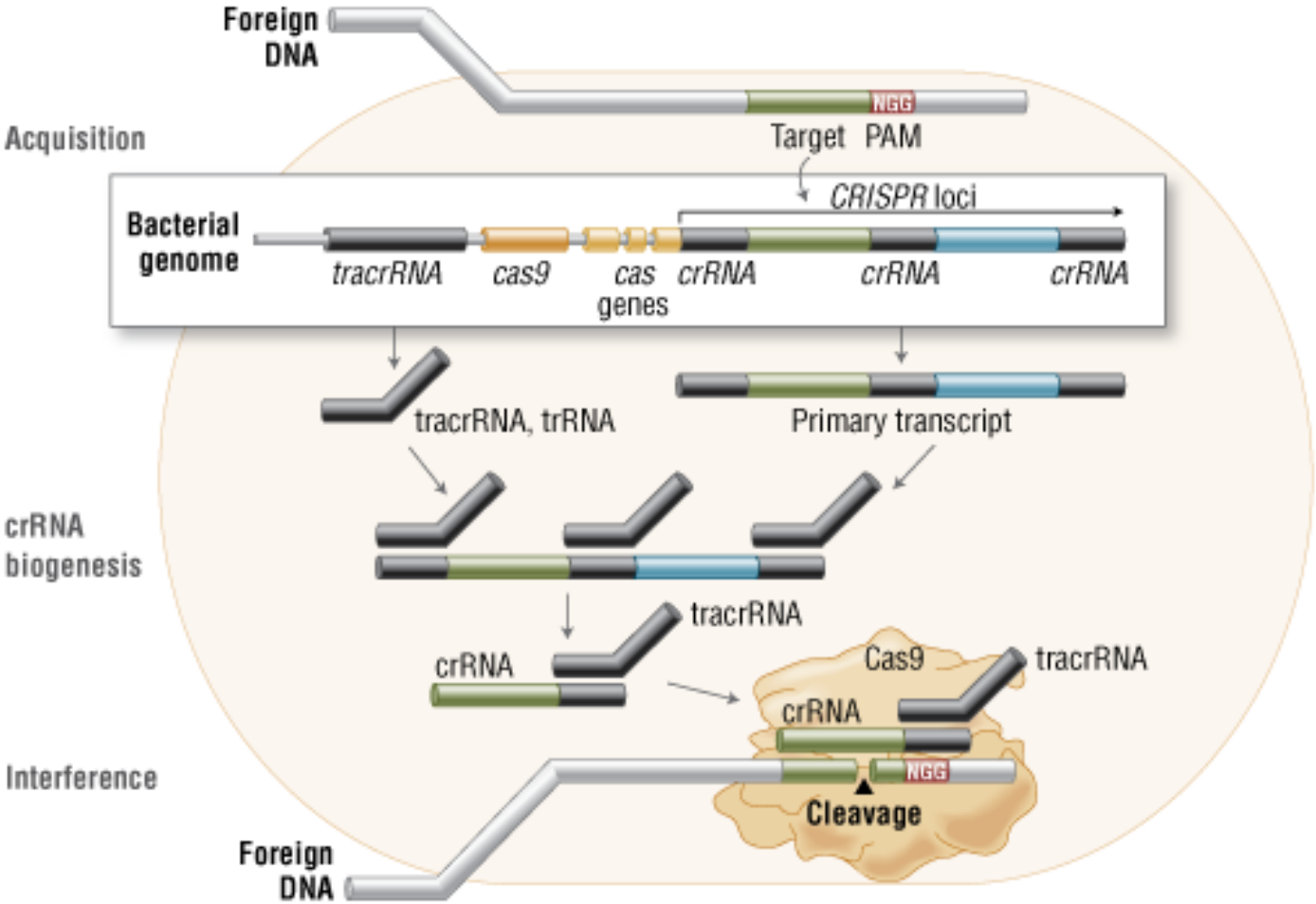
**CRISPR** (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)



**CRISPR** (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)



# CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)



# CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)

**sgRNA:** (*single-guide RNA*) Consta de dos partes:

- Región variable, **crRNA:** (*CRISPR RNAs*) Región complementaria al gen target, normalmente de unos 20 nucleótidos.
- Región constante, **tracrRNA:** (*trans-activating crRNA*). Tiene una región complementaria a crRNA. Es la secuencia de unión a Cas9.

**PAM:** (*Protospacer adjacent motif*) motivo de 2-6 pb que se encuentra inmediatamente después del gen de interés. Su secuencia depende del tipo de bacteria de la que se aísle Cas9 (NGG para *S. pyogenes*). Cas9 provoca una rotura de doble cadena ~3 pb aguas arriba de PAM.

- **(2003)** Mojica (izquierda) descubre que CRISPR es un sistema inmunitario con el que las bacterias se protegen de las infecciones víricas.



- **(2012)** Charpentier y Doudna (derecha) identifican los elementos mínimos de CRISPR con los que se puede cortar el ADN, abriéndose así la puerta a la **edición de genomas** (el llamado “*corta y pega genético*”).



# CRISPR en Ingeniería Genética

Journal List > RNA Biol > v.10(5); 2013 May 1 > PMC3737341



RNA Biol. 2013 May 1; 10(5): 841–851.

PMCID: PMC3737341

Published online 2013 Mar 27. doi: [10.4161/rna.24203](https://doi.org/10.4161/rna.24203)

## crRNA and tracrRNA guide Cas9-mediated DNA interference in *Streptococcus thermophilus*

Tautvydas Karvelis,<sup>1,†</sup> Giedrius Gasiunas,<sup>1,†</sup> Algirdas Miksys,<sup>1</sup> Rodolphe Barrangou,<sup>2</sup> Philippe Horvath,<sup>3</sup> and Virginijus Siksnys<sup>1,\*</sup>

[Author information](#) ▶ [Article notes](#) ▶ [Copyright and License information](#) ▶

This article has been [cited by](#) other articles in PMC.

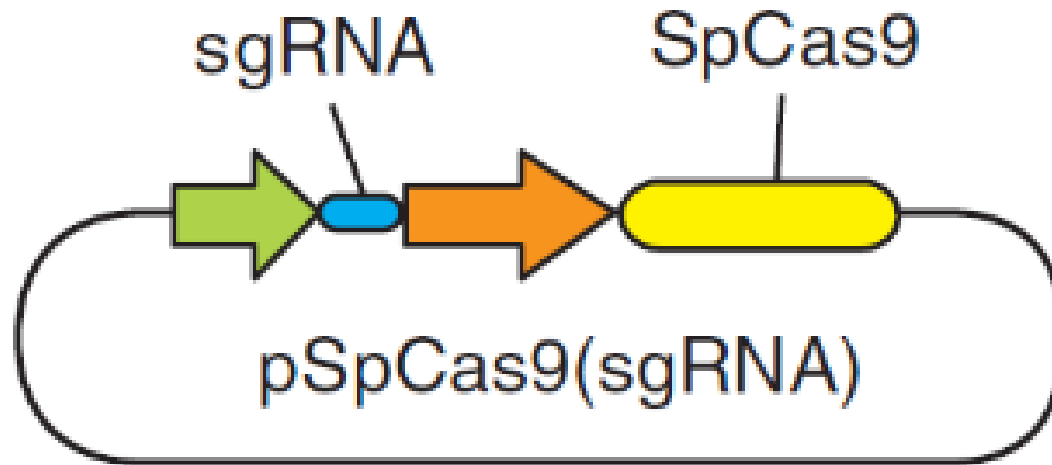
### Abstract

Go to:

The Cas9-crRNA complex of the *Streptococcus thermophilus* DGCC7710 CRISPR3-Cas system functions as an RNA-guided endonuclease with crRNA-directed target sequence recognition and protein-mediated DNA cleavage. We show here that an additional RNA molecule, tracrRNA (trans-activating CRISPR RNA), co-purifies with the Cas9 protein isolated from the heterologous *E. coli* strain carrying the *S. thermophilus* DGCC7710 CRISPR3-Cas system. We provide experimental evidence that tracrRNA is required for Cas9-mediated DNA interference both in vitro and in vivo. We show that Cas9 specifically promotes duplex formation between the precursor crRNA (pre-crRNA) transcript and tracrRNA, in vitro. Furthermore, the housekeeping RNase III contributes to primary pre-crRNA-tracrRNA duplex cleavage for mature crRNA biogenesis. RNase III, however, is not required in the processing of a short pre-crRNA transcribed from a minimal CRISPR array containing a single spacer. Finally, we show that an in vitro-assembled ternary Cas9-crRNA-tracrRNA complex cleaves DNA. This study further specifies the molecular basis for crRNA-based re-programming of Cas9 to specifically cleave any target DNA sequence for precise genome surgery. The processes for crRNA maturation and effector complex assembly established here will contribute to the further development of the Cas9 re-programmable system for genome editing applications.

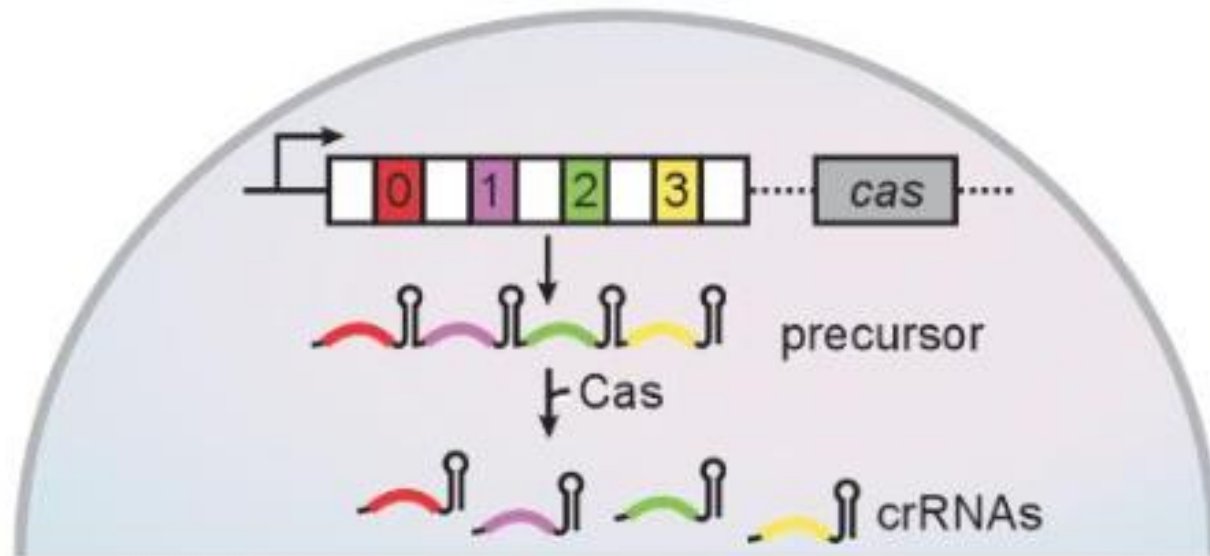
**Keywords:** CRISPR, DNA silencing, Type II CRISPR-Cas systems

# CRISPR en Ingeniería Genética



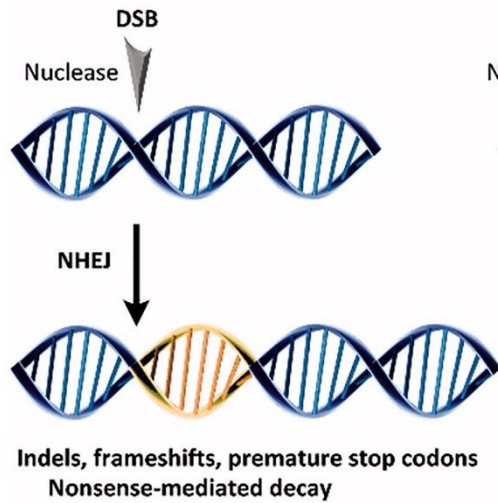
*Especificidad y customización*

# CRISPR en Ingeniería Genética

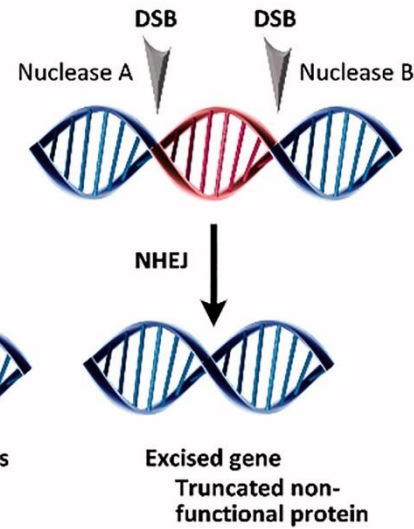


*Edición simultánea de varios genes*

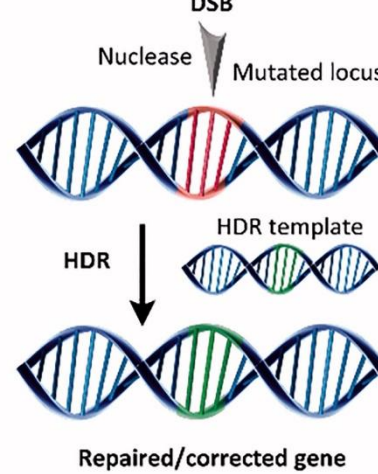
(A) **Gene Knockout**



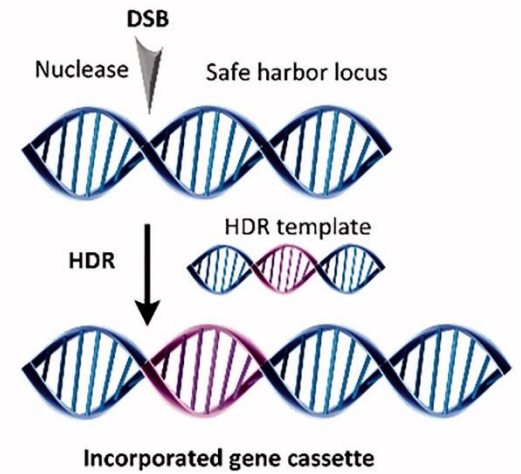
(B) **Gene Deletion**



(C) **Gene Correction**



(D) **Gene Addition**



Lino et al. (2018). Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Deliv.*, 25(1):1234-1257.

# Características principales de los nuevos sistema de edición génica

	ZFN	TALEN	CRISPR/Cas9
<b>Nuclease</b>	Fok1	Fok1	Cas9
<b>DNA binding molecule</b>	ZF Protein	TALE protein	GuideRNA (gRNA)
<b>Type</b>	Fusion protein → High effort to modify for new targeting site	Fusion protein → High effort to modify for new targeting site	Protein + RNA → Easy to modify → Multiple targeting possible
<b>Binding sites</b>	2 sites (15 or 18 bp each) → High specificity → Low risk for off-target effects	2 sites ( $\geq$ 13 bp each) → High specificity → Low risk for off-target effects	1 site (18-20 bp + 3bp PAM) → Lower specificity → Higher risk for off-target effects

Especies	Modificaciones ADN	Nucleasas	Targets	Referencias
Arroz ( <i>Oryza sativa</i> L.)	Mutación (SDN-1)	TALEN	OsBRI1, OsDEP1	Chen et al., <i>Methods</i> . 69:2-8, 2014
	Mutación (SDN-1)	TALEN	Gen OsSWEET14	Li et al., <i>Nat. Biotechnol.</i> 30, 390–392, 2012
	Mutación (SDN-1)	TALEN	Genes OsDEP1, OsBADH2, OsCKX2, OsSD1	Shan et al., <i>Mol. Plant</i> 6, 1365–1368, 2013
	Mutación (SDN-1)	CRISPR/Cas	Os MPK5	Xie & Yang, <i>Mol. Plant</i> 6, 1975–1983, 2013
	Mutación (SDN-1)	CRISPR/Cas	Genes OsCAO1, OsLAZY1	Miao et al., <i>Cell Res.</i> 23, 1233–1236, 2013
	Mutación (SDN-1)	CRISPR/Cas	Familia de genes OsCDK	Endo et al. <i>in Rice</i> . 1, 1–7, 2014
	Mutación (SDN-1)	CRISPR/Cas	Genes OsSWEET11/14	Jiang et al. <i>Nucleic Acids Res.</i> 41, e188–e188, 2013
	Mutación (SDN-1)	CRISPR/Cas	Genes OsPDS, OsBADH2, Os02g23823, OsMPK2	Shan et al. <i>Nat. Biotechnol.</i> 31, 686–688, 2013
	Mutación (SDN-1)	CRISPR/Cas	Genes OsROC5, OsSPP, OsYSA	Feng et al. <i>Cell Res.</i> 23, 1229–1232, 2013
	Mutación (SDN-1)	CRISPR/Cas	Genes OsPDS, PMS3, EPSPS, DERF1, SH1, MYB5, MYB1, ROC5, SPP, YSA	Zhang et al. <i>Plant Biotechnol. J.</i> 1–11., 2014
	Mutación (SDN-1)	CRISPR/Cas	Genes OsSWEET11/13/1a/1b	Zhou et al. <i>Nucleic Acids Res.</i> 42, 10903–10914, 2014.
	Gran deleción (SDN-1)	CRISPR/Cas	Clusters de genes relacionados con diterpenos de labdano. On Chr 2, 4, 6	Zhou et al. <i>Nucleic Acids Res.</i> 42, 10903–10914, 2014
	Sustitución de genes (SDN-2)	ZFN	Gen IPK1	Shukla et al. <i>Nature</i> 459, 437–441, 2009
	Sustitución de genes (SDN-2)	CRISPR/Cas	Gen PDS	Shan et al. <i>Nat. Biotechnol.</i> 31, 686–688, 2013

Maíz ( <i>Zea mays</i> L.)	Mutación (SDN-1)	Meganucleasa (I-SceI)	Transgén	Yang et al., 2009
	Mutación (SDN-1)	Meganucleasa (I-CreI*)	Secuencia intergénica (adyacente al promotor del gen <i>liguleless 1</i> )	Gao et al. <i>Plant J.</i> 61, 176–187, 2010
	Mutación (SDN-1)	Meganucleasa (I-CreI*)	Gen ZmMS26	Djukanovic et al. <i>Plant J.</i> 76, 888–899, 2010
	Mutación (SDN-1)	TALEN	Genes ZmPDS, ZmIPK1A, ZmIPK, Zm MRP4	Liang et al. <i>J. Genet. Genomics</i> 41, 63–68, 2014
	Mutación (SDN-1)	CRISPR/Cas	Gen ZmIPK	Liang et al. <i>J. Genet. Genomics</i> 41, 63–68, 2014
	Mutación (SDN-1)	CRISPR/Cas	Gen ZmHKT1	Xing et al., 2014
	Inserción gen (SDN-3)	ZFN	TLPs (inserción de tolerancia a los herbicidas AAD1 y genes PAT).	Ainley et al. <i>Plant Biotechnol. J.</i> 11, 1126–1134, 2013
Sorgo ( <i>Sorghum bicolor</i> L.)	Mutación (SDN-1)	CRISPR/Cas	Transgén (DsRED2)	Jiang et al. <i>Nucleic Acids Res.</i> 41, e188–e188, 2013
Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> L.)	Mutación (SDN-1)	TALEN	Gen TaMLO	Wang et al. <i>Nat. Biotechnol.</i> 1–6, 2014
	Mutación (SDN-1)	CRISPR/Cas	Gen TaMLO	Shan et al. <i>Nat. Biotechnol.</i> 31, 686–688, 2013

Cebada ( <i>Hordeum vulgare</i> L.)	Mutación (SDN-1)	TALEN	Gen PAPHy_a	Wendt et al. <i>Plant Mol. Biol.</i> 83, 279–285, 2013
	Mutación (SDN-1)	TALEN	Transgén	Gurushidze et al. <i>PLoS One</i> 9, 1–9, 2014
<i>Brachypodium distachyon</i> L.	Mutación (SDN-1)	TALEN	Genes BdABA1, CKX2, SMC6, SPL, SBP, COI1, RHT, HTA1	Shan et al. <i>Mol. Plant</i> 6, 1365–1368, 2013
Haba de soja ( <i>Glycine max</i> L.)	Mutación (SDN-1)	ZFN	Genes GmDCL1a/b, DCL4a/b, RDR6a, HEN1a, transgén	Curtin et al. <i>Plant Physiol.</i> 156, 466–473, 2011
	Mutación (SDN-1)	TALEN	Genes GmFAD2-1A/B	Haun et al. <i>Plant Biotechnol. J.</i> 1–7., 2014
Algodón ( <i>Gossypium</i> sp.)	Inserción gen (SDN-3)	Meganucleasa (I-CreI*)	Secuencia intergénica, junto a un locus Bt pre-existente (inserción de hppd, epsps)	D'Halluin & Ruiters, <i>Int. J. Dev. Biol.</i> 57, 621–627, 2013
Colza ( <i>Brassica napus</i> L.)	Regulación de expresión génica	Activador viral ZF-VP16	Gen BnKasII	Gupta et al. <i>Plant Biotechnol. J.</i> 10, 783–791, 2012
Tabaco ( <i>Nicotiana tabacum</i> L.)	Reemplazo gen (SDN-2)	ZFN	Genes NtSuRA/B (inserción de alelos mutados confiriendo tolerancia a herbicida)	Townsend et al. <i>Nature</i> 459, 442–445, 2009
	Reemplazo gen (SDN-2)	TALEN	Genes NtSuRA/B (inserción de alelos mutados confiriendo tolerancia a herbicida)	Zhang et al. <i>Plant Physiol.</i> 161, 20–27, 2013
Petunia ( <i>Petunia hybrida</i> Hook.)	Mutación (SDN-1)	ZFN	Transgén	Marton et al. <i>Plant Physiol.</i> 154, 1079–1087, 2010
Manzana ( <i>Malus x domestica</i> Borkh.)	Mutación (SDN-1)	ZFN	Transgén	Peer et al., 2014
Higuera ( <i>Ficus carica</i> L.)	Mutación (SDN-1)	ZFN	Transgén	Peer et al. <i>Planta.</i> 241:941-51, 2015
Naranja dulce ( <i>Citrus sinensis</i> L.)	Mutación (SDN-1)	CRISPR/Cas	Gen CsPDS	Jia et al. <i>PLoS One</i> 9, e93806, 2014