



La colza (*Brassica napus*) es un cultivo donde se ha demostrado el uso de la edición genómica, y concretamente del sistema CRISPR/Cas9.

**José Antonio Jarillo y  
Manuel Piñeiro**

Centro de Biotecnología  
y Genómica de Plantas  
(CBGP, UPM-INIA).  
Universidad Politécnica  
de Madrid (UPM) -  
Instituto Nacional  
de Investigación y  
Tecnología Agraria y  
Alimentaria (INIA).  
Madrid

## Potencial de las técnicas de mejora genética de precisión en agroalimentación

Las técnicas de edición genómica desarrolladas en los últimos años tienen el potencial para introducir de forma precisa y barata caracteres de interés en especies vegetales cultivadas por su valor agronómico. En concreto la tecnología CRISPR de edición génica ha revolucionado este campo al abrir las puertas a la mejora genética de precisión en cultivos. En este artículo se describen brevemente algunos ejemplos de cómo esta tecnología emergente permite abordar de forma controlada y eficiente una gran variedad de problemas del sector agroalimentario y contribuir así a garantizar la seguridad alimentaria en nuestro planeta.

## El reto de la seguridad alimentaria global

El incremento de la población mundial ha propiciado que la demanda de alimentos a nivel global aumente de forma continua. Por ello, uno de los principales retos de la agricultura es garantizar la seguridad alimentaria, haciendo frente a diversos factores que, como el cambio climático o la aparición de nuevas plagas y enfermedades, amenazan la producción agrícola a escala mundial. Las técnicas de mejora genética tradicional han facilitado el desarrollo de cultivos de mayor calidad y más productivos. Sin embargo, la obtención de nuevas variedades usando esta tecnología requiere bastante tiempo y se encuentra limitada por la disponibilidad de variación genética que permita introducir caracteres de interés en los cultivos. Además, la mejora tradicional de determinados caracteres de importancia agronómica (por ejemplo, rendimiento) frecuentemente va en detrimento de otros caracteres como el sabor, propiedades nutricionales, etc, que indudablemente son importantes para el consumidor. Por tanto, es necesario desarrollar nuevas tecnologías que permitan afrontar el reto de la seguridad alimentaria con garantías de que los agricultores dispondrán de variedades capaces de satisfacer las demandas crecientes de alimento de calidad de manera sostenible y asequible, y en un entorno de condiciones climáticas cambiantes a menudo desfavorables para mantener la producción.

### Mejora genética de precisión en cultivos: la revolución CRISPR/Cas9

El desarrollo reciente de técnicas de edición genómica ha abierto las puertas a la optimización dirigida y precisa de caracteres de interés en cultivos agrícolas. Esta tecnología permite modificar específicamente una región determinada del genoma o de un gen concreto para introducir un rasgo deseable en un cultivo, como puede ser la resistencia a plagas y enfermedades, la tolerancia a sequía o altas temperaturas, o la optimización de caracte-

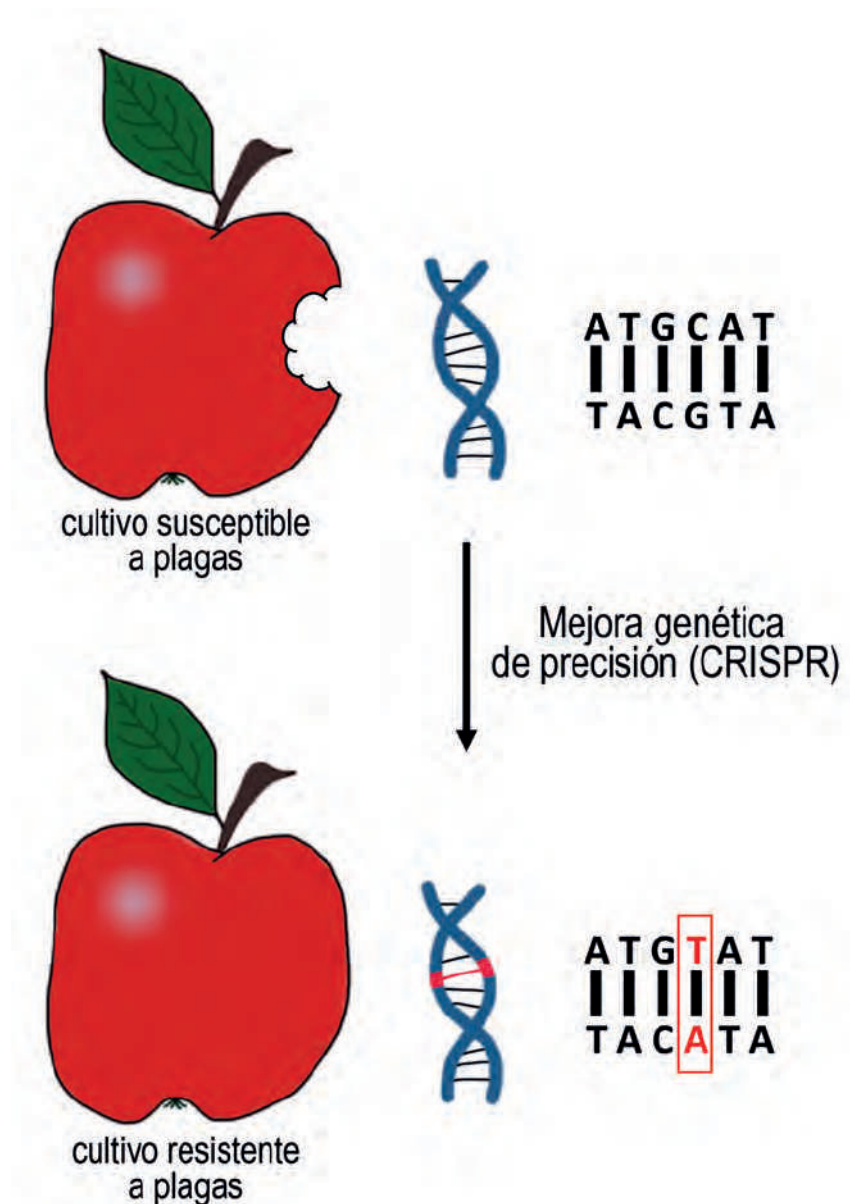


Figura 1. La mejora genética de precisión permite editar regiones concretas del genoma para introducir caracteres de interés en cultivos; por ejemplo, la resistencia a plagas/enfermedades.

res de calidad y rendimiento (Figura 1). Por tanto, la edición genómica representa una herramienta para la mejora genética de precisión en especies agrícolas y dispone del potencial para acelerar la generación de variedades portadoras de un amplio abanico de caracteres deseables con un coste económico reducido, contribuyendo así a afrontar los retos de la agricultura y garantizar la seguridad alimentaria en el futuro. A diferencia de los organismos modificados genéticamente (OMGs), las variedades generadas por edición génica no contienen material genético procedente de otros orga-

nismos y no deberían ser considerados como transgénicos.

Durante los últimos años, diversos trabajos científicos han demostrado que es posible el uso de tecnologías de edición genómica basadas en el empleo de nucleasas específicas de secuencia para modificar el genoma de organismos animales y vegetales, incluidas especies cultivadas (Gaj y col., 2013; Kim, 2016; Yamamoto, 2015). Estas nucleasas actúan como tijeras moleculares que introducen cortes en el ADN que constituye el material genético de las células. Las incisiones producidas en sitios específicos del genoma son reparadas

por la propia maquinaria celular, haciendo posible la generación de cambios controlados en el material genético del organismo.

La primera generación de nucleasas empleadas en edición genómica estuvo basada en las llamadas nucleasas de dedo de zinc (Zinc-Finger Nucleases, ZFN) y las TALENs (del inglés, Transcription Activator-like Effector Nucleases). El procedimiento para dotar a estas nucleasas de especificidad de secuencia de reconocimiento en el genoma es relativamente complejo y tedioso. De ahí que el desarrollo de una segunda generación de nucleasas basadas en el uso del sistema llamado CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR Associated 9), cuyo diseño es mucho más sencillo, barato y preciso, haya revolucionado el campo de la edición genómica (Jiang y Doudna, 2017). El sistema CRISPR de edición genómica funciona de forma robusta en plantas y será sin duda alguna la herramienta de elección para la mejora de precisión en cultivos agrícolas (Belhaj y col., 2015).

El descubrimiento y la descripción del sistema CRISPR se puede considerar *made in Spain*, ya que en gran parte se debe al trabajo del investigador Francisco Juan Martínez Mojica (Universidad de Alicante). Sus estudios sobre secuencias repetidas presentes en diversas bacterias y arqueobacterias le llevaron a develar la existencia de los elementos CRISPR en el material genético de estos organismos (Mojica y col., 2000). Su investigación posterior, junto con la de diversos equipos internacionales, permitió concluir que estas secuencias repetidas eran parte de una especie de sistema inmunitario que tienen algunas bacterias para defenderse de los virus que las infectan (Mojica y col., 2005; Jinek y col., 2012; Wiedenheft y col., 2012). Este mecanismo de defensa bacteriano está constituido por dos elementos básicos: una proteína llamada Cas9 con actividad nucleasa (las tijeras moleculares que cortan el ADN), y un pequeño ARN llamado ARN guía. Esta molécula de ARN se caracteriza por tener una secuencia complementaria a la del

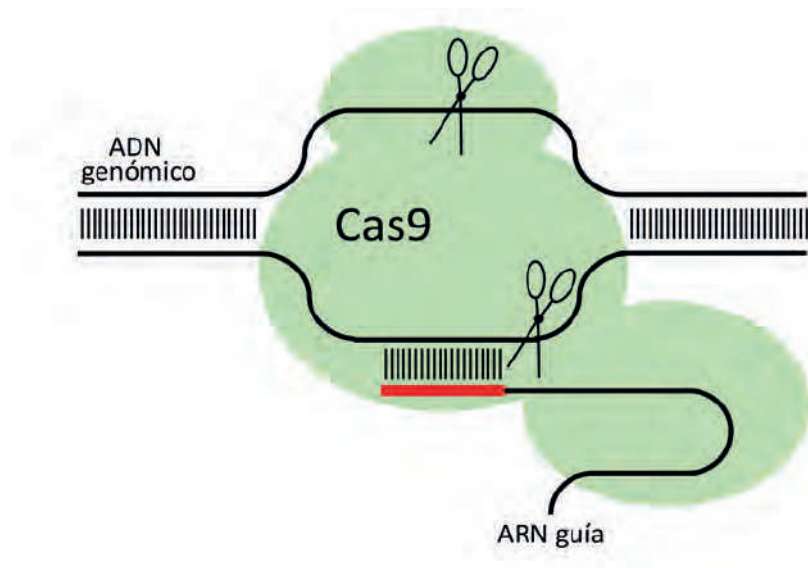


Figura 2. El sistema CRISPR/Cas9 permite editar con precisión regiones específicas del genoma mediante un ARN guía, que reconoce la secuencia diana de interés en el ADN de un cultivo, y la nucleasa Cas9, que realiza incisiones en dicho ADN.

ADN invasor que es la diana de este sistema de defensa de bacterias. El ARN guía es capaz de conducir a la nucleasa Cas9 hasta el ADN foráneo portador de la secuencia diana reconocida por el ARN guía. De esa forma, este sistema de dos componentes tiene la capacidad de reconocer un ADN invasor que se introduce en la bacteria y promover su corte a través de la actividad de la nucleasa Cas9, evitando así la infección por el virus.

El descubrimiento y descripción del sistema CRISPR de bacterias es un ejemplo de cómo una investigación básica, dirigida a comprender el papel de repeticiones de secuencia presente en ciertas bacterias, ha acabado dando lugar a multitud de aplicaciones en diversas áreas de la biotecnología y la biomedicina (Hsu y col., 2014; Wang y col., 2014). Posteriormente, las investigadoras Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna percibieron el potencial para 'domesticar' este mecanismo ancestral de defensa en bacterias y convertirlo en una herramienta de edición genómica (Jinek y col., 2012). Si se introducen los dos componentes del sistema CRISPR/Cas9 en células de cualquier organismo y se modifica la secuencia del ARN guía para que reconozca una secuencia de interés en el genoma de dicho organismo, la nucleasa Cas9 será capaz de producir incisiones de

forma precisa en la secuencia seleccionada (Figura 2). Al generar cortes en el material genético, la maquinaria celular de reparación del ADN se pone en marcha para restaurar el daño generado. Esta maquinaria de reparación tiene cierta tendencia a introducir errores, dando lugar a cambios en la secuencia del ADN genómico, causando mutaciones. Sin embargo, si se le proporciona a la maquinaria de reparación celular una molécula de ADN adicional que tenga secuencias complementarias a las que rodean la zona de corte de Cas9, y que sea portadora de cambios respecto al genoma original, los mecanismos de reparación emplearán ese ADN como molde y provocarán la incorporación de los cambios deseados en el genoma. Habremos conseguido de esta forma editar el genoma, introduciendo en el mismo las correcciones deseadas de forma precisa y controlada. Esta tecnología ha permitido el desarrollo de plantas cultivadas portadoras de caracteres de interés, demostrando el gran potencial que las herramientas de edición genómica ofrecen en el campo de la mejora agrícola.

### El movimiento se demuestra andando: casos de éxito en el uso de CRISPR

Existen actualmente publicaciones que describen el uso del sistema

# los especialistas en

***Tuta absoluta***



**PRODUCTOS AUTORIZADOS**  
en cultivos ecológicos  
Registrados para tomate y berenjena

**ecothrín**<sup>®</sup>  
plant insecticide

**acaridoil**<sup>®</sup>  
plant acaricide

de edición genómica mediado por CRISPR en más de veinte especies cultivadas. En la mayor parte de ellas se han diseñado correcciones en el genoma de estos cultivos para mejorar su rendimiento, su tolerancia a estreses ambientales como sequía, o temperaturas extremas, etc, o la resistencia frente a patógenos (Bao y col., 2019). En el espacio de este artículo es imposible recoger de forma exhaustiva todos estos trabajos, por lo que nos limitaremos a reseñar brevemente algunos casos que ilustran la utilidad de esta tecnología para abordar una amplia variedad de problemas del sector agroalimentario.

La defensa vegetal es uno de los campos donde el uso de esta tecnología emergente ha mostrado gran potencial. En tomate se han generado variedades resistentes a la infección por el hongo del oídio mediante el uso de CRISPR. Los alelos activos del gen *Mlo* de tomate (*Solanum lycopersicum*) confieren susceptibilidad a la infección por este hongo, por lo que la inactivación de ese gen mediante técnicas de edición ha resultado en tomates resistentes al patógeno. En este trabajo se emplearon además técnicas de secuenciación masiva para demostrar que la variedad resultante era portadora de cambios únicamente en el gen *Mlo1*, mientras que el resto del genoma no había sufrido ninguna alteración adicional (Nekrasov y col., 2017). Esta aproximación ilustra cómo es posible introducir la resistencia al hongo en variedades de élite de tomate a través de un procedimiento sencillo y preciso que no requiere más de nueve meses, al contrario de lo que ocurre con los procedimientos de mejora genética tradicional, que resultan mucho más tediosos. Estrategias similares de edición genómica se han seguido en trigo (*Triticum aestivum*), una especie hexaploide y que por tanto lleva seis copias de cada gen *Mlo*, obteniéndose igualmente resistencia al hongo. Esto confirma que es posible editar simultáneamente genes homólogos que comparten secuencias similares (Wang y col, 2014).

Este procedimiento de mejora de precisión en cultivos se ha empleado también para obtener variedades mejor adaptadas a condiciones am-

## / La defensa vegetal es uno de los campos donde el uso del sistema de edición genómica mediado por CRISPR ha mostrado gran potencial /

bientales subóptimas que afectan a la producción. La producción de polen con gametos masculinos viables en plantas de tomate es extremadamente sensible a las temperaturas altas. Puesto que la formación de frutos depende de la fecundación, las altas temperaturas que acompañan al calentamiento global pueden representar una amenaza para la producción de este importante cultivo hortícola. Desarrollar variedades que permitan la formación de frutos sin fecundación es por tanto una vía de interés para evitar las posibles consecuencias negativas del cambio climático. Se ha demostrado que la inactivación de ciertos genes que impiden el desarrollo del fruto en ausencia de fecundación posibilita el crecimiento de frutos partenocárpicos (sin semillas). En concreto, la inactivación mediante CRISPR del gen *SIAGL6* de tomate resulta en plantas capaces de producir frutos sin semillas pero de tamaño y forma normales en condiciones de estrés por temperaturas altas, que reducen drásticamente la producción de plantas de tomate no editadas (Klap y col., 2017). Otros estudios han desarrollado estrategias para mejorar la tolerancia a la sequía, por ejemplo en maíz. En este caso particular la tecnología CRISPR ha permitido editar el genoma de este cultivo para sustituir las regiones reguladoras de un gen, ARGOS8, que protege al maíz frente a la sequía, por otras secuencias reguladoras también de

maíz que permiten alcanzar mayores niveles de expresión de ARGOS8. Estas plantas editadas se cultivaron junto con la variedad original sin editar en diversas localizaciones de los Estados Unidos con diferentes niveles de disponibilidad de agua. Aunque las variedades editadas mantenían la misma producción que las no editadas cuando los cultivos no sufrieron limitaciones de agua, cuando las plantas de maíz estuvieron sometidas a estrés hídrico durante el periodo de floración, los cultivos editados mostraron un incremento significativo en la producción de grano. Estas observaciones ponen de manifiesto la utilidad de los sistemas de edición genómica para la mejora de la tolerancia a sequía en cultivos de maíz (Shi y col., 2016). Este no es el único trabajo que está desarrollando la empresa Dupont Pioneer para mejorar diversos aspectos del maíz, un cultivo de gran trascendencia en EE. UU. y en otros lugares del mundo. Por ejemplo, esta empresa estadounidense ha escogido también la tecnología CRISPR para desarrollar una nueva variedad 'waxy' de maíz (<https://biovox.eu/insights/detail/dupont-pioneer-s-next-generation-of-waxy-corn-shows-the-green-side-of-crispr-cas9>). El maíz de tipo 'waxy' es conocido desde hace años ya que existen mutaciones naturales que producen un tipo de maíz con un almidón característico que ofrece ventajas para su uso en la industria agroalimentaria. En breve veremos estas nuevas variedades de maíz en el mercado ya que la regulación norteamericana no impone la misma reglamentación a los cultivos generados por mejora genética de precisión que a los organismos modificados genéticamente. También se han utilizado aproximaciones CRISPR para obtener variedades con almidón de tipo 'waxy' de patata (Andersson y col., 2017) o de arroz (Zhang y col., 2018).

El empleo de la tecnología CRISPR también podría tener gran impacto en la industria alimentaria. Los enfermos celíacos muestran consistentemente reacciones inflamatorias ante el consumo de harinas de cereales convencionales por su contenido en gluten. En el Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC) de Córdoba se propusieron el desarrollo de varieda-

des de trigo con niveles reducidos de gluten que pudieran ser aptos para el consumo por enfermos celíacos. Para ello emplearon una estrategia CRISPR dirigida a disminuir el contenido del grano de trigo en proteínas de tipo gliadina, que son las responsables mayoritarias del gluten presente en el grano de este cereal básico en nuestra alimentación. Con esta aproximación consiguieron disminuir significativamente el contenido en proteínas del gluten en el grano de trigo, así como la reactividad de su harina frente a los anticuerpos comerciales que se emplean en la industria alimentaria para medir la presencia del gluten en alimentos. Además, no afectó de forma significativa a la producción de grano en estos trigos editados, abriendo una esperanza para el futuro desarrollo de variedades de trigo deficientes en gluten (Sánchez-León y col., 2018).

Esta tecnología se ha mostrado también útil para prolongar la vida post-cosecha de productos agrícolas. Un ejemplo de ello lo encontramos en una variedad de champiñón común (*Agaricus bisporus*) que se ha desarrollado de nuevo en EE. UU. mediante el uso de esta tecnología CRISPR (Waltz, 2016). Todos hemos presenciado cómo los champiñones ennegrecen de forma rápida y natural en las estanterías de los supermercados o de nuestros propios frigoríficos. Mediante edición génica se ha conseguido prolongar el color blanco de los champiñones en el mercado a través de la inactivación del gen que codifica el enzima responsable de este oscurecimiento, una polifenol oxidasa, que genera el color pardo en los champiñones, así como en diversas verduras tras la cosecha. Estas setas comerciales, puesto que no son portadoras de ningún material genético procedente de otro organismo vivo, han recibido la aprobación de la autoridad estatal de EE. UU. (el Departamento de Agricultura, USDA, por sus siglas en inglés) para su distribución en el mercado.

## Perspectivas de futuro para la mejora genética de precisión

Los ejemplos que hemos descrito brevemente hasta ahora ilustran diversos

usos de esta tecnología, cuyas aplicaciones empezaron a desarrollarse a partir de la publicación de la Dras. Charpentier y Doudna en la prestigiosa revista *Science* en el año 2012 (Jinek y col., 2012), lo que da idea de la celeridad con la que se ha implantado en diversos ámbitos de la investigación y la mejora vegetal. Este procedimiento de bajo coste permite la introducción rápida de caracteres de interés en cultivos mediante la edición precisa de sus genomas, sin que las variedades resultantes sean portadoras de material genético procedente de otros organismos. La versatilidad de esta técnica permite además la corrección simultánea de varios genes para conseguir los rasgos buscados en especies agrícolas.

La próxima generación de herramientas CRISPR que se están desarrollando para la agricultura van más allá de la edición basada en la reparación de las roturas que se generan en el ADN, sino que aprovecharán la capacidad de los sistemas CRISPR de ser dirigidos a secuencias específicas. Tras la inactivación del dominio nucleasa de Cas9, que es distinto del dominio de reconocimiento de ADN, estas proteínas dirigidas al ADN diana pueden fusionarse con varias actividades enzimáticas, las cuales podrían ser utilizadas para visualizar regiones genómicas específicas, y directamente regular transcripción génica o inducir modificaciones epigenéticas dirigidas (Adli, 2018; Gao, 2018).

Una limitación para la mejora de las herramientas de CRISPR en agricultura es la liberación efectiva de la maquinaria CRISPR en las células apropiadas y la regeneración de plantas viables. Las técnicas tradicionales de cultivo *in vitro* son los métodos más usados de transformación, pero son lentos, laboriosos y con tendencia a generar mutaciones somáticas, lo cual reduce la ganancia de eficiencia facilitada por las herramientas de CRISPR. Además, muchos cultivos son recalcitrantes a la regeneración por cultivo de tejidos. Por ello, será necesario desarrollar nuevos métodos de transformación para incrementar la eficiencia en la edición de genomas de plantas. Esto podría incluir el uso de potenciadores de regeneración que posibiliten el cultivo

de tejidos en especies recalcitrantes o incluso la liberación directa de la maquinaria CRISPR en los meristemos apicales o en granos de polen, para obtener plantas editadas sin el paso por cultivo *in vitro* (Gao, 2018). Por otra parte, la perspectiva y el impacto que esta tecnología tenga en la agricultura futura dependerán en gran medida de la estructura legal que regule su uso (Agapito-Tenfen y col., 2018). Países como Argentina o, muy significativamente, EE. UU., han decidido no tratar legalmente a los cultivos sujetos de edición genómica de la misma forma que los organismos modificados genéticamente (transgénicos). En cambio, el Tribunal de Justicia de la Unión Europea (TJUE) ha legislado recientemente (julio de 2018), amparándose en un principio de precaución, que las variedades generadas por procesos de edición génica deben estar sometidas a los mismos controles que los organismos modificados genéticamente. La comunidad científica, así como amplios sectores de la industria agroalimentaria, han alertado del peligro que supone esta reglamentación para la competitividad de un sector de importancia capital en la economía europea (Faure y Napier 2018; Wight, 2018). Todo ello dejando aparte las dificultades técnicas que puede entrañar el control de variedades generadas por estos métodos que no dejan rastro en el genoma y que por tanto pueden ser muy difíciles de distinguir de mutaciones que aparecen de forma espontánea en la naturaleza o en el marco de programas de mejora genética tradicionales. Estas y otras reflexiones han llevado a determinados países de la UE a posicionarse en contra de esta sentencia, por lo que el futuro desarrollo de esta tecnología flota sobre arenas movedizas en Europa, aunque no en otras regiones del planeta. Cabe esperar que los criterios científicos pesen en la decisión que finalmente sea adoptada con respecto al uso de esta tecnología revolucionaria que supone la mejora genética de precisión y que podría contribuir a garantizar la seguridad alimentaria a nivel global.

## Bibliografía

- ! Adli M (2018). The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat Commun.* 9:1911
- Agapito-Tenfen SZ, Okoli AS, Bernstein MJ, Wikmark OG, Myhr AI. (2018). Revisiting Risk Governance of GM Plants: The Need to Consider New and Emerging Gene-Editing Techniques *Front Plant Sci.* 9:1874.
- Andersson M, Turesson H, Nicolai A, Falt AS, Samuelsson M, Hofvander P (2017) Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. *Plant Cell Rep* 36: 117–128
- Bao A, Burritt DJ, Chen H, Zhou X, Cao D, Tran LP. (2019). The CRISPR/Cas9 system and its applications in crop genome editing. *Crit Rev Biotechnol.* 15:1-16.
- Belhaj K, Chaparro-García A, Kamoun S, Patron N, Nekrasov V. (2015) . Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. *Curr Opin Biotech.* 32:76–84.
- Faure JD, Napier JA. Europe's first and last field trial of gene-edited plants? (2018) *Elife.* Dec 18;7. pii: e42379.
- Gaj, T., Gersbach, C. A., and Barbas, C. F. (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* 31, 397–405.
- Gao C. (2018) The future of CRISPR technologies in agriculture. *Nat Rev Mol Cell Biol.*;19:275-276.
- Hsu PD, Lander ES, Zhang F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 157:1262-78.
- Jiang F, Doudna JA. (2017). CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms. *Ann Rev Biophys.* 46:505–29.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., and Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816–821.
- Kim JS. (2016). Genome editing comes of age. *Nat Protoc.*9:1573-8.
- Klap C, Yeshayahu E, Bolger AM, Arazi T, Gupta SK, Shabtai S, Usadel B, Salts Y, Barg R. (2017). Tomato facultative parthenocarp results from SIAGAMOUS-LIKE 6 loss of function. *Plant Biotechnol J.*15:634-647
- Mojica, F.J., Diez-Villaseñor, C., Soria, E., and Juez, G. (2000). Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol. Microbiol.* 36, 244–246.
- Mojica, F. J., Diez-Villasenor, C., Garcia-Martinez, J., and Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J. Mol. Evol.* 60, 174–182.
- Nekrasov V, Wang C, Win J, Lanz C, Weigel D, Kamoun S (2017). Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. *Sci Rep.*;7:482.
- Sánchez-León S, Gil-Humanes J, Ozuna CV, Giménez MJ, Sousa C, Voytas DF, Barro F. (2018). Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol J.* 16:902-910.
- Shi J, Gao H, Wang H, Lafitte HR, Archibald RL, Yang M, Hakimi SM, Mo H, Habben JE. (2017). ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnol J.*15: 207–216.
- Yamamoto, T (ed.). (2015). Targeted Genome Editing Using Site-Specific Nucleases, ZFNs, TALENs, and the CRISPR/Cas9 system Springer. 205 pp. ISBN 978-4-431-55226-0 (hbk/ebk). e11899.
- Waltz, E (2016). Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation. *Nature* 532, 293.
- Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C, Qiu JL. (2014). Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol.*;32:947–951.
- Wang H, La Russa M, Qi LS. (2016). CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. *Annu Rev Biochem.* 85:227-64.
- Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA (2012) RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* 482: 331–338.
- Wight, A. (2018). EU gene-editing rule squeezes science. *Nature* 563:15-16.
- Zhang J, Zhang H, Botella JR, Zhu JK. (2018). Generation of new glutinous rice by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the Waxy gene in elite rice varieties. *J Integr Plant Biol.* 60:369-375.