

# **Treball final de grau**

**Estudi: Grau en Innovació i Seguretat Alimentària**

**Títol: Incidència de Tecnologies CRISPR/Cas d'Edició Genètica en l'Obtenció de Noves Varietats de Fruita**

**Document:**

**Alumne:** Ferran Picart Pérez

**Tutor:** Emilio Montesinos Seguí

**Departament:** EQATA

**Àrea:** Producció Vegetal

**Convocatòria (mes/any) Setembre 2021**



# AGRAÏMENTS

Agraeixo a les diferents persones involucrades en l'elaboració d'aquest treball pel seu suport en moments com els viscuts durant aquest últim any, ja sigui per part de la institució educativa de la Universitat de Girona com amics i familiars sense els quals no hagués estat possible arribar a tancar aquesta etapa.

Gràcies,

Ferran

# GLOSSARI

**CRISPR:** Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (seqüències palindròmiques repetides i regularment espaiades i agrupades).

**Cas:** CRISPR associada utilitzada per denominar les proteïnes associades al mecanisme de defensa CRISPR-Cas, Cas9 com exemple.

**T-DNA:** transfer DNA o DNA de transferència associat al plasmidi inductor de tumors d'*Agrobacterium tumefaciens*.

**ZFN:** Zinc finger nucleases.

**TALENs:** Transcription activator-like effector nucleases.

**ADN/DNA:** Àcid desoxiribonucleic.

**OMG:** Organisme modificat genèticament.

**USDA:** United States Department of Agriculture.

**EMS:** Metanosulfonat d'etil.

**SRSR, SPIDR, LTRs:** Acrònims anteriors a CRISPR.

**crRNA:** ARN CRISPR, àcid ribonucleic associat a CRISPR

**tracrRNA:** trans-activating CRISPR RNA, ARN CRISPR trans-activador.

**crRNA:tracrRNA:** Complex d'ARN guia CRISPR

**PAM:** Protospacer adjacent motif, seqüència adjacent al protoespaiador.

**RNP:** Ribonucleoproteïna.

**NHEJ:** Non homologous end joining, reparació per recombinació no homòloga mitjançant unió terminal.

**HDR:** Homology directed repair, reparació per recombinació homòloga.

**CRISPRi:** Interferència CRISPR.

**CRISPRa:** Activació CRISPR.

**dCas9:** Dead endonuclease Cas9, Proteïna Cas9 sense activitat nucleasa.

# ÍNDEX

1.	Objectius i Mètodes .....	1
<b>1.1</b>	<b>Objectius</b> .....	1
<b>1.2</b>	<b>Mètodes</b> .....	1
<b>1.3</b>	<b>Gestor bibliogràfic</b> .....	2
2.	Introducció .....	2
3.	Antecedents .....	3
3.1	Mètodes aleatoris de mutagènesi; Físics i químics .....	4
3.2	Mètodes de mutagènesi específics; CRISPR .....	7
4.	Sistema CRISPR Cas .....	11
4.1	Classificació dels sistemes CRISPR Cas .....	11
4.2	CRISPR Cas “toolkit” .....	13
<b>4.2.1</b>	<b>CRISPR CAS9</b> .....	13
<b>4.2.2</b>	<b>Maquinària de reparació de l’ADN i el “knockout” i “knock-in” genètic</b> .....	15
<b>4.2.3</b>	<b>Modificacions de la proteïna Cas9: Dcas9</b> .....	16
<b>4.2.4</b>	<b>Proteïna Cpf1 (cas12a)</b> .....	16
5.	Edició genètica en fruiters .....	18
5.1	Tomatera .....	21
5.2	Cítrics .....	24
5.3	Plàtanera .....	25
5.4	Pomera .....	26
5.5	Vinya .....	27
5.6	Síndria .....	28
5.8	Maduixera .....	30
6.	Conclusions .....	31
7.	Annexes .....	32
7.1	Varietats de fruita obtingudes mitjançant mètodes físics i químics de mutagènesi .....	32
7.2	Varietats de fruita obtingudes amb CRISPR .....	43
8.	Bibliografia .....	44

## 1. OBJECTIUS I MÈTODES

### 1.1 OBJECTIUS

Els objectius d'aquesta recerca bibliogràfica són recollir el màxim d'informació del tema possible i sintetitzar-la dins d'un mateix document de forma ordenada, coherent i així facilitar l'accés d'aquesta informació a qui pugui estar interessat.

### 1.2 MÈTODES

Els mètodes duts a terme per l'elaboració d'aquest treball han estat el filtrat d'articles referents al tema d'interès mitjançant paraules clau relacionades amb les tecnologies CRISPR i el cultiu dels fruiters. Aquestes paraules clau s'introdueixen en bases de dades científiques que es poden accedir des del portal de la biblioteca de la Universitat de Girona conjuntament amb l'"Scholar google" o el cercador "PubMed".

Exemples d'aquestes paraules per inserir en els motors de cerca són:

CRISPR Cas	<i>CRISPR Cas</i>	<i>CRISPR Cas</i> in
<i>Cas9</i>	mechanisms	berry fruit
<i>PAM</i>	<i>CRISPR Cas</i>	<i>CRISPR Cas</i>
<i>tracrRNA</i>	review	<i>immune mechanism</i>
<i>crRNA</i>	<i>CRISPR Cas</i> in	<i>CRISPR Cas</i> over
<i>pre-crRNA</i>	tomato crop	plant improved
<i>CRISPR Cas</i>	<i>CRISPR Cas</i> in	defense
genome editing in	apple, pear crop	mechanisms
fruit crops	<i>CRISPR Cas</i> in	<i>CRISPR Cas</i>
<i>CRISPR Cas</i>	<i>Vitis vinífera</i>	protein
		classification

Un cop obtinguts els articles es classificaven segons els apartats en els que es puguin utilitzar dins l'estructura del treball de recerca bibliogràfica i en cas d'esser necessari es torna a buscar informació més concreta per completar la ja obtinguda.

En molts casos es troba que un article està redactat amb citacions interessants, en molts casos trobar l'article citat ja sigui per PubMed, Scholar Google o altres bases de dades accessibles des de la biblioteca de la Universitat de Girona, ha servit per complementar informació que d'altra manera hagués set més difícil de trobar. En aquest sentit s'ha partit d'articles en format "Review" i a mesura que s'anava completant la informació se n'ha buscar de més específics fins a citar-ne de format tipus recerca experimental.

### 1.3 GESTOR BIBLIOGRÀFIC

S'utilitzarà el gestor bibliogràfic Mendeley programat per generar les referències bibliogràfiques mitjançant el mètode Vancouver. El mètode Vancouver estableix que les referències han d'estar enumerades consecutivament seguint l'ordre en què es mencionen per primera vegada en el text, utilitzant nombres aràbics en parèntesi. En quant a la redacció bibliogràfica cada referència conté els següents elements obligatoris: autor, títol, editor, origen i data de publicació. Altres apartats com l'extensió, autors secundaris i localització del document són, en general, opcionals.

En referència a la gestió i organització d'articles, aquests s'organitzen en carpetes segons la tipologia i apartat mencionat dins del treball. Així en cas de necessitar revisar la informació d'algun apartat del treball, poder trobar-la de forma ràpida i segura.

## 2. INTRODUCCIÓ

La fruita és un aliment que aporta molt valor i beneficis per a la nutrició humana ja que ens aporta sucres, fibra, vitamines, minerals i aigua. Tanmateix degut al canvi climàtic han aparegut noves malalties i plagues que anteriorment no presentaven la recurrència o incidència dins la zona geogràfica Europea, posant en perill les produccions autòctones malmetent aquesta font de nutrients (1). Fet que afecta negativament als agricultors ajustant els seus costos de producció. Amb tots aquests factors s'ha formulat la necessitat d'accelerar la producció de noves varietats on molts esforços s'han destinat a partir de mètodes tradicionals de millora i enginyeria genètica. Els primers esmentats anteriorment es caracteritzen per la necessitat d'invertir grans quantitats de temps (2) en contraposició als mètodes més novells de l'enginyeria genètica. En aquest darrer cas s'inclouen les “*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*” o CRISPR, unes seqüències d'origen bacterià que formen el pilar de la seva defensa immunitària adquirida davant els atacs de virus bacteriòfags. La modificació de les proteïnes associades a aquestes seqüències CRISPR o també anomenades proteïnes *Cas*, per a desenvolupar eines d'edició genètica, han suposat guanyar el premi Nobel de Química el 2020 a les investigadores Emmanuele Charpentier i Jennifer Doudna. Modificació que possibilita l'edició de seqüències específiques de qualsevol organisme amb una precisió de fins a una base. Aquest mètode s'ha guanyat el sobrenom de “*tisores moleculars*”. Els talls que efectuen les tecnologies CRISPR segons la modificació a les quals es vegin sotmeses les seves proteïnes *Cas* permeten modificacions genètiques diverses, que van des de la modificació, el silenciament o l'activació de gens específics.

Les tecnologies utilitzades per la millora es basen principalment en mètodes físics, químics (com les radiacions gamma o el metanosulfonat d'etil) i biològics (T-DNA o la inserció de transposons) provocant mutacions puntuals, reestructuracions, delecions i duplicacions genètiques (3). Fins l'actualitat tres tècniques d'edició



genètica són les més rellevants, les *zinc finger nucleases*(ZFN), les *transcription activator-like effector nucleases* (TALENs) i les *clustered regularly interspaced short palindròmic repeats* (CRISPR) les quals són capaces de fer un doble tall de cadena d'ADN a qualsevol seqüència específica per les quals s'hagin dissenyat, permetent una edició genètica de precisió (4). D'aquestes tres eines les tecnologies CRISPR han aconseguit una gran popularitat degut a ser les més eficients, econòmiques i de fàcil aplicació amb comparació a les TALENs o ZFN (5), degut a que les dos anteriors requereixen una gran complexitat de disseny al ser mètodes que utilitzen una interacció proteïna-àcid nucleic (6).

Tanmateix la majoria de tècniques de modificació genètica són poc acceptades per la societat. L'adopció d'una legislació altament restrictiva, dins el marc legislatiu Europeu, dificulta la seva comercialització elevant els costos que han d'assumir les empreses i organismes investigadors (7).

Un avantatge que es suma a les tecnologies CRISPR és que al ser una tecnologia que no depèn de la inserció d'un gen per a la seva transformació, ni de la necessitat d'introduir gens marcadors per contraseleccionar els transformants, a més de que no és rastrejable en general de manera que alguns països no es considera l'organisme modificat com un organisme modificat genèticament (OMG), com és el cas del marc regulador dels Estats Units d'Amèrica per la USDA (8)(9). Aquest no és el cas de la Unió Europea, tot i que sembla haver-hi un moviment en la mateixa línia.

## 3. ANTECEDENTS

Durant el Neolític l'*Homo sapiens* va experimentar un canvi important a l'hora de relacionar-se amb el seu entorn, la domesticació de cultius van fer possible que canvis d'un estil de vida nòmada a sedentari (10). En aquestes dates ja es van començar a fer passes per a la millora de cultius, triant les varietats que fenotípicament tinguessin les característiques més interessants per la supervivència del grup. Aquestes són causades per mutacions espontànies que juntament amb la selecció dels exemplars més interessants va donar lloc a la descripció del fenomen com a selecció artificial per Charles Darwin el 1859 (11). Tanmateix aquesta selecció

artificial al cap dels anys va portar a un efecte de coll d'ampolla disminuint la reserva genètica (12). Actualment, en conseqüència l'agricultura es centra en 15-20 espècies que dominen la producció d'aliments (13). Aquest coll d'ampolla és el que ha promogut que durant el segle 20 es desenvolupessin noves tecnologies per induir mutacions (14) i obtenir noves varietats de les espècies cultivables.

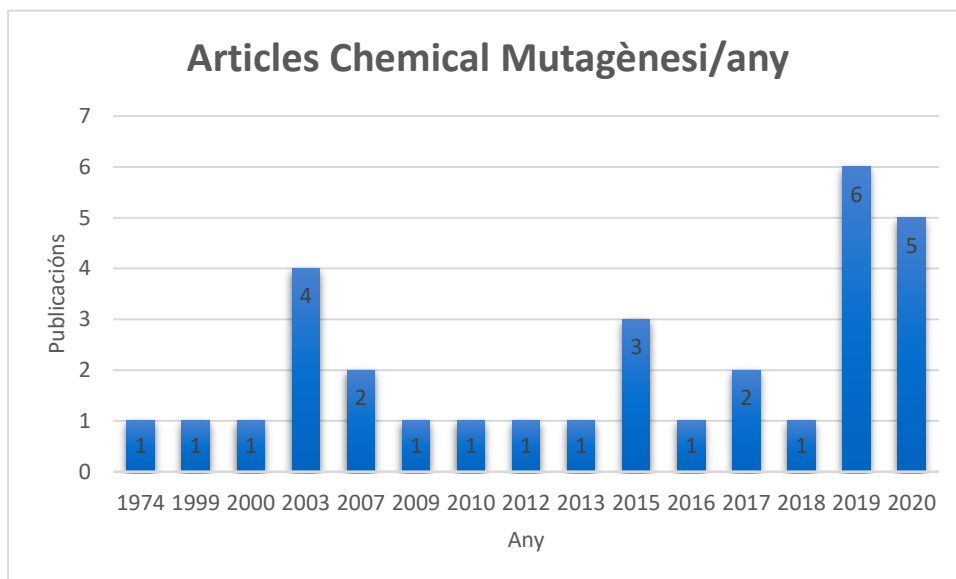
#### 3.1 MÈTODES ALEATORIS DE MUTAGÈNESI; FÍSICS I QUÍMICS

Una de les primeres tècniques per generar mutacions aleatòries va ser amb mètodes físics, que es va iniciar l'any 1927. Muller va observar que s'incrementava la taxa de mutacions en la mosca de la fruita *Drosophilla* en un 15% amb la utilització de rajos X (15). Estudi extrapolat al món alimentari un any després quan Stadler va observar el mateix efecte en blat de moro (16) i a les llavors d'ordi exposades a rajos X i Radi (17). Amb l'avenç de tecnologies en centres de recerca de tecnologies nuclears es va introduir la radiació gamma i de neutrons (18). Posteriorment durant la Segona Guerra Mundial es va començar a treballar amb agents químics menys agressius, més accessibles, segurs i fàcils de manipular (18), entre ells l'EMS (metanosulfonat d'etil) el qual és capaç de provocar principalment transicions de GC a AT (19). Actualment es troben 12 varietats de pomera validades, que han estat resultat de mutagènesi per mètodes físics i 1 varietat mitjançant mètodes químics<sup>1</sup> utilitzant EMS que es presenten a la *Taula 1*, i en altres fruiters que s'indiquen en els *Annexes 7.1*.

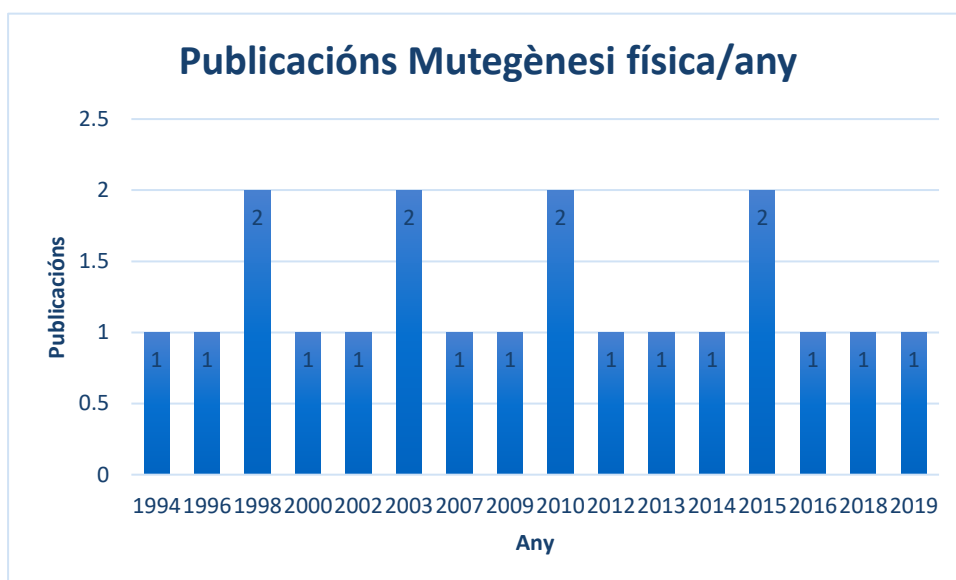
Tanmateix el nombre de publicacions en els darrers anys sobre aquests mètodes són merament residuals com es pot observar en el *Gràfic 1* i *Gràfic 2*. Aquests mètodes tot i ser imprecisos degut a la aleatorietat de les mutacions que provoquen sorprèn que la societat els tingui més ben acceptats a nivell legislatiu contrastant les restriccions a les que s'ha d'enfrontar un producte desenvolupat per enginyeria genètica i en particular per CRISPR.

---

<sup>1</sup> <https://mvd.iaea.org>



Gràfic 1. Articles publicats a PubMed sobre mutagènesi química per any amb criteris de cerca "Chemical mutagenesis in fruit crops".



Gràfic 2. Articles publicats a PubMed sobre mutagènesi física per any amb criteris de cerca "Physical mutagenesis in fruit crops".

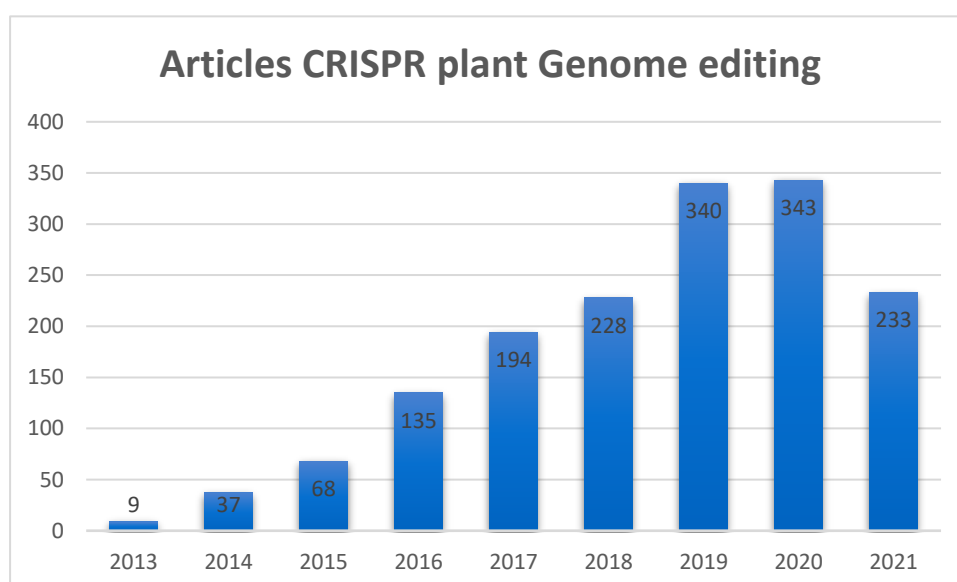
Taula 1. Varietats de poma obtingudes mitjançant mètodes de mutagènesi físics i químics aprovats<sup>2</sup> informació ampliada als annexes.

Nom Varietat	Nom Llatí	Nom Commú	Mètode	Millora	País	Registre
Mori-hou-fu 3A	<i>Malus pumila Mill.</i>	Poma	Rajos $\gamma$ (60 Gy)	Resistència malalties	Japó	1963
McIntosh 8F-2-32	<i>Malus pumila Mill.</i>	Poma	Rajos $\gamma$	Color pell, resistència fúngica	Canadà	1970
Blackjoin BA 2 520	<i>Malus pumila Mill.</i>	Poma	Rajos $\gamma$ (50 Gy)	Millora intensitat i distribució color	França	1970
Lysgolden	<i>Malus pumila Mill.</i>	Poma	Rajos $\gamma$ (50 Gy)	Evita russeting	França	1970
Courtagold	<i>Malus pumila Mill.</i>	Poma	Rajos $\gamma$	Reducció mida arbre, internodes	França	1972
Courtavel	<i>Malus pumila Mill.</i>	Poma	Rajos $\gamma$	Reducció mida arbre, internodes	França	1972
Dovar	<i>Malus sp.</i>	Poma	Rajos X (30-35 Gy)	Fulles Variegades	Països Baixos	1978
Senbatsu-Fuji-2-Kei	<i>Malus pumila Mill.</i>	Poma	Rajos $\gamma$ (60-30 Gy)	Excel·lent color vermell	Japó	1985
Shamrock	<i>Malus pumila Mill.</i>	Poma	Hibridació amb varietat radiada	Ràpida maduració, creixement en zones nòrdiques		1986
Golden Haidegg	<i>Malus pumila Mill.</i>	Poma	Rajos $\gamma$ (50 Gy)	Fruits més grossos, concentració de la maduració del fruit, sense russeting, pell llisa i brillant, vida útil en fred més llarga, millor gust, color groc-vermell	Àustria	1986
Donghengahongpingguo	<i>Malus sp.</i>	Poma	Rajos $\gamma$ (250 Gy)	Estructural	Xina	1987
James Grieve Double Red	<i>Malus sp.</i>	Poma	Rajos $\gamma$ (62 Gy)	Gust ben equilibrat, rati àcid-sucres, major rendiment	República Txeca	1995
Belrene	<i>Malus pumila Mill.</i>	Poma	EMS	Maduració ràpida, fruits més grans i color intens	França	1970

<sup>2</sup> <https://mvd.iaea.org>

### 3.2 MÈTODES DE MUTAGÈNESI ESPECÍFICS; CRISPR

Existeix un gran augment de publicacions relacionades amb les tecnologies d'edició genètica CRISPR, ZFN i TALENs, específicament a CRISPR que es presenta en el Gràfic 3. S'observa com hi ha un tendència a l'alça tot i que el nombre d'articles publicats sobre la millora de cultius és encara limitat en comparació a les seves aplicacions mèdiques. Sorpren que les primeres mencions d'aquestes tecnologies vinguin de tant enrere com l'any 1987 (20) on un grup de científics Japonesos estudiaven una regió del gen *iap* d'*Escherichia coli*, i no és fins el 2013 que comencen a publicar-se treballs sobre CRISPR.



**Gràfic 3. Publicacions a PubMed sobre articles d'edició genètica amb CRISPR utilitzant els criteris de cerca "CRISPR genome plant editing".**

No va ser fins els anys 90, gràcies al desenvolupament de les tecnologies de seqüenciació, que les seqüències observades el 1987 van reunir més atenció, tot degut a la observació de seqüències semblants (21) en *Haloferax mediterraneii*, *Haloferax volcanii* (22) o *Mycobacterium tuberculosis* (23), entre altres(24). En aquest moment encara no s'havia encunyat l'acrònim utilitzat a l'actualitat lo que feia que els articles publicats sobre les seqüències CRISPR no fossin clarament identificats fins el 2002. Fruit d'un consens entre Mojica i Jansen s'arriba a un acord per estandarditzar l'acrònim com CRISPR, que és ràpidament adoptat per la resta d'investigadors (25). Acrònims anteriors a CRISPR es

poden trobar com SRSR, SPIDR o LTRs (25). El fet de que fossin seqüències repetides en un gran ventall d'archaeas i bacteris formulava preguntes sobre la seva funcionalitat. Una primera pista va sorgir al observar que les seqüències intercalades en aquestes seqüències palindròmiques estan compostats per ADN viral (26), originant una hipòtesi sobre un possible sistema immunitari adquirit en procariotes (27). Aquesta hipòtesi es confirma el 2007 mitjançant una sèrie de *challenge tests* exposant soques de *Staphylococcus termophilus*, a la infecció de bacteriòfags. Sorprenentment els supervivents d'aquest test de contacte integraven noves seqüències CRISPR corresponents al les infeccions víriques on es formula una correlació directa entre mida de la seqüència CRISPR i resistència als bacteriòfags(28). És a dir a major seqüència CRISPR major nombre de seqüències víriques adquirides i en conseqüència major immunitat. En aquest punt l'interès en CRISPR creix i l'objectiu de la investigació CRISPR canvia de la funcionalitat a aclarir els elements moleculars clau d'aquest nou sistema immunitari en procariotes.

Des del punt de vista molecular la seqüència CRISPR es transcriu sencera en un pre-crRNA (CRISPR RNA) amb la informació de tots els seus espaiadors inclosa, és a dir, acumula totes les seqüències virals de l'organisme que inicia la seva resposta que amb CRISPR ha anat adquirint al llarg de la seva vida. Aquestes seqüències víriques s'han de processar per poder interactuar amb la proteïna *Cas9*. Primerament es talla cada seqüència vírica i se li adjunta una cadena d'ARN que s'anomena ARN trans activat, el qual fa la funció de facilitar l'enllaç de la seqüència vírica amb la proteïna *Cas9*. Aquest complex crRNA:tracrRNA és el responsable de guiar les proteïnes *Cas* cap a la seva diana de restricció, ja que és complementària a la seqüència del crRNA (29). Tanmateix el crRNA no és suficient per dirigir la restricció sinó que necessita una seqüència PAM (seqüència adjacent al protoespaiador), pròpia de cada proteïna *Cas*. Aquesta seqüència PAM millora la seva eficiència i precisió ja que si la proteïna *Cas* no la detecta per molt que el crARN s'adjunti a la seva seqüència complementària no s'activaran els seus dominis nucleasa i en conseqüència no s'efectuarà el tall de doble cadena (30). En cas d'identificar la seqüència PAM i l'anellament de l'ARN guia, s'activen els centres actius amb activitat nucleasa de la ribonucleoproteïna (RNP) *Cas9*, efectuant un doble tall a la cadena d'ADN. El tall es produeix exactament a 3 nucleòtids de l'extrem 3' de la seqüència del PAM(31). Amb tot aquest mecanisme al descobert, les investigadores Doudna i Charpentier van lligar caps adonant-se que el sistema pot ser re-programat utilitzant una seqüència, sintètica, d'ARN guia d'una sola cadena (sgRNA de les sigles en anglès single-guide RNA), imitant el

complex crRNA:tracrRNA (32). Des de llavors les tecnologies basades en CRISPR van augmentar de forma vertiginosa basats en proteïnes *Cas* (*Cas9*, *Cpf1* o una forma amb el centre amb activitat nucleasa desactivat *dCas9*) que permeten l'edició del genoma, control transcripcional (6) o alteracions epigenètiques (33).

Les tecnologies CRISPR tenen molt potencial per la seva versatilitat per generar plantes amb productes alimentaris sostenibles i en són molts els que estan en procés de ser modificats (3). Entre ells s'espera que les tomateres editades amb CRISPR tinguin millor gust, contingut de sucres i aroma en comparació a les varietats comercials modernes (34), blat de moro més resistent a l'estrès hídric amb un alt rendiment per hectàrea (35) o blat més resistent a l'oïdi (36). Entre d'altres modificacions que puguin ser dirigides per CRISPR es presenten a la *Taula 2* algunes varietats que la USDA ha alliberat de revisió i que poden comercialitzar-se sense formar part de la legislació d'OMG.

**Taula 2. Cultius no sotmesos a revisió per la USDA, aprovats utilitzant tecnologies d'edició genètica tipus CRISPR Cas 9 (37).**

Data Resposta USDA	Institució	Característica i planta modificada amb CRISPR Cas9
10/16/2017	USDA ARS, Plant Science Research Unit (St. Paul, Minnesota)	Soja ( <i>Glycine max</i> ) Resistència sequera i halotolerància, Interferència gens <i>Drb2a</i> i <i>Drb2b</i>
8/29/2017	Yield 10 Bioscience (Woburn, Massachusetts)	Camelina amb alt contingut d'olis; gens diana no especificats
04/07/2017	Donald Danforth Plant Science Center (St. Louis)	<i>Setaria viridis</i> , mill, amb temps de floració alentit; desactivant el gen homòleg del <i>Zea mays ID1</i>
4/18/2016	DuPont Pioneer (Johnston, Iowa)	Blat de moro amb alta composició d'amilopectina; aconseguir inactivant el gen <i>Wx1</i> .
4/13/2016	The Pennsylvania State University (University Park, Pennsylvania)	Xampinyó ( <i>Agaricus bisporus</i> ) resistència a l'enfosquiment enzimàtic; inactivant el gen que codifica per la polifenol oxidasa

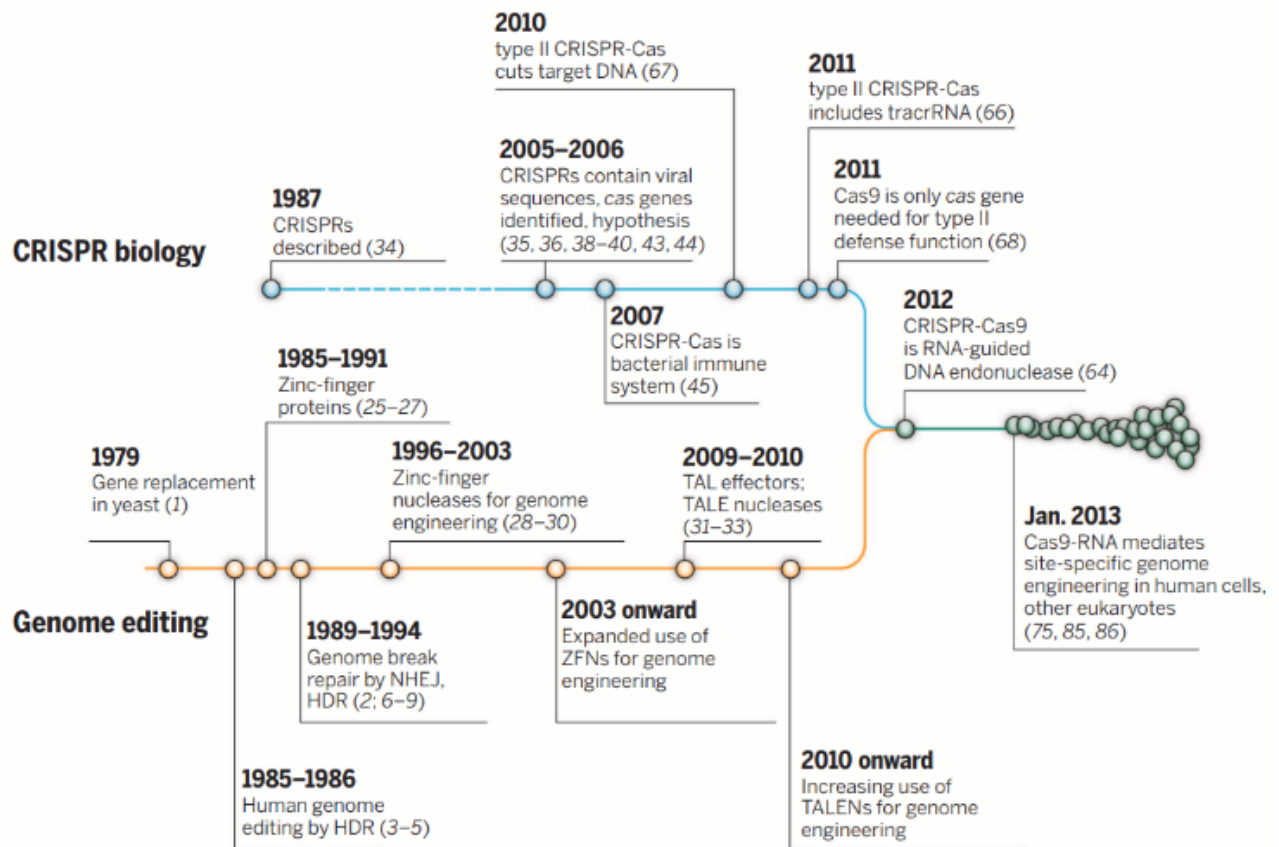


Figura 1. Cronologia sobre el desenvolupament de tecnologies d'edició genètica CRISPR, ZFN, TALENs (5).



## 4. SISTEMA CRISPR CAS

### 4.1 CLASSIFICACIÓ DELS SISTEMES CRISPR CAS

Els primers esforços per tipificar i classificar les proteïnes *Cas* remunta al 2005 quan es van definir fins a 45 proteïnes *Cas* agrupades en famílies (Cas1, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6), 8 subcategories de CRISPR Cas i un mòdul de proteïnes associades a processos de reparació desconeguts o RAMP (repair associated misterious protein) en el genoma de procariotes (38) els quals van creixent a mesura que es va investigant. La classificació filogenètica actual de les proteïnes *Cas* s'organitza en la següent jerarquia (39):

- Classe: Composta per dues la 1 la integren sistemes CRISPR els quals actuen a partir d'un complex de varies proteïnes *Cas*, mentre que la classe dos efectua la interferència a partir d'una sola gran proteïna.
- Tipus i subtipus: Els quals fan referència a gens pràcticament exclusius de cada categoria.

Aquesta classificació actualment consta de 2 classes, 6 tipus i 33 subtipus dels quals el 2015 se'n coneixien 2 classes, 5 tipus i 16 subtipus (39). Les diferències entre les proteïnes de la classe 1 no només es basen en el tipus d'enzim que efectua la interferència sinó que n'hi ha d'altres com el procés per el qual es processa el pre-crARN, els sistemes CRISPR Cas de classe 1 que utilitza nucleases diferents a les de classe 2 per madurar el pre-crARN, i la càrrega de la seqüència de l'espaiador o el tall de la diana (40).

**Taula 3. Classificació i nomenclatura per sistemes CRISPR Cas(39).**

Jerarquia	Evidència	Classificació	Nomenclatura Gen
Classe	Única Proteïna	2	
Tipus	Dos dominis HEPN	VI	cas13
Subtipus	Similaritat no detectable amb altres famílies de Cas13	VI-B	cas13b
Variant	Branca diferent cas13b1; codifica un gen auxiliar únic csx28	VI-B1	cas13b1

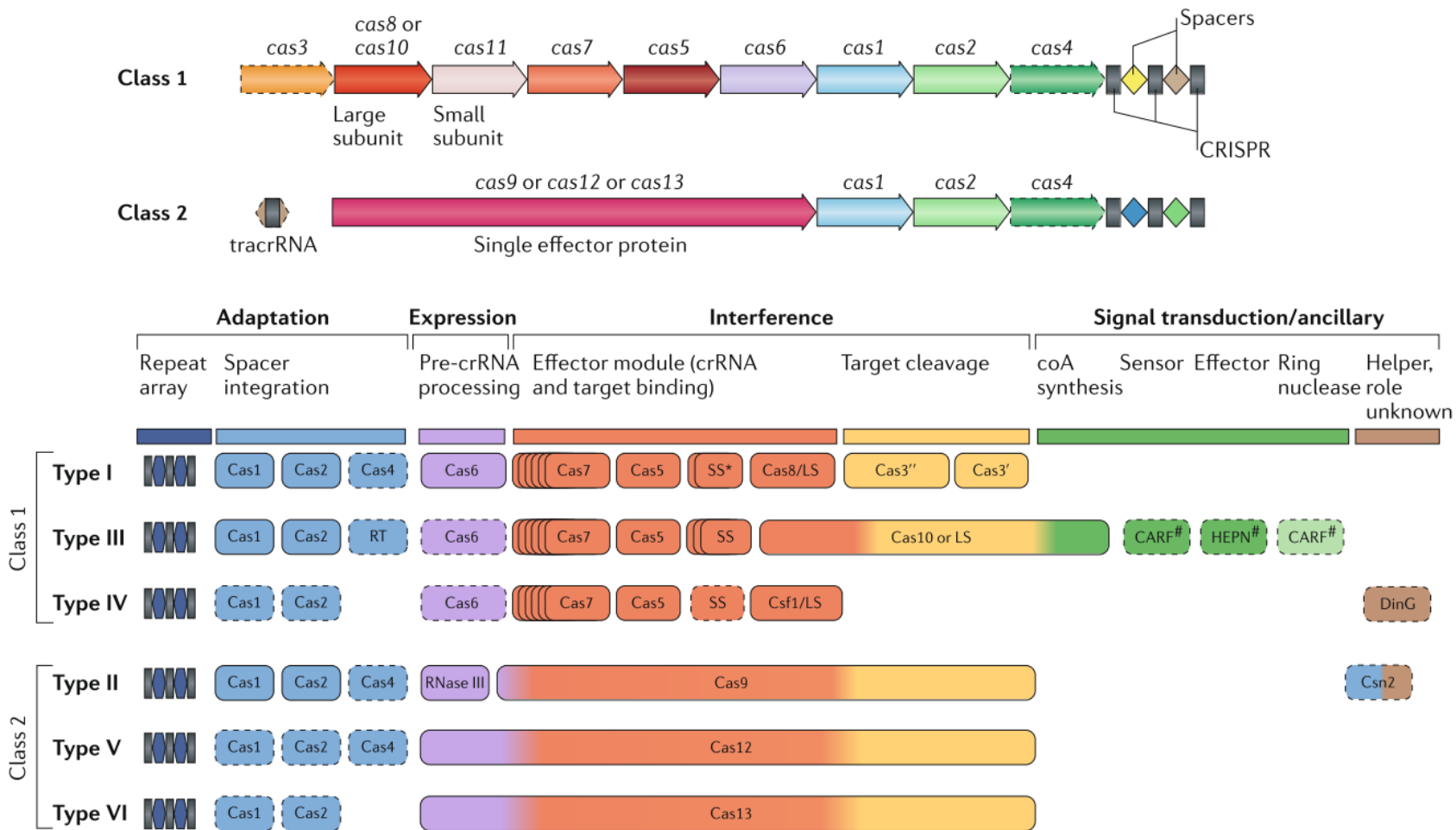


Figura 2. Classes de sistema CRISPR Cas i la seva organització modular (39)

## 4.2 CRISPR CAS “TOOLKIT”

### 4.2.1 CRISPR CAS9

Es podria dividir el mecanisme CRISPR en tres fases; adquisició, expressió i interferència, en les quals les proteïnes, principalment *Cas1* i *Cas2*, adquireixen el fragment del plasmidi o virus invasor integrant nous espaiadors dins la seqüència CRISPR de l'hoste (41). Seguidament aquests espaiadors es transcriuen formant cadenes d'ARN amb la informació dels espaiadors complementaris a l'ADN invasor i un petit fragment de la cadena de repeticions palindròmiques, les quals tenen un paper de guia per a les endonucleases (42).

En aquest treball ens centrarem principalment en els sistemes basats en la classe 2, tipus dos els quals actuen a partir d'un sol enzim (*Cas9* també referida com *SpyCas9* degut al seu origen en *Streptococcus pyogenes* (43)) .

La proteïna *Cas9* és una proteïna gran formada per múltiples dominis els quals dos d'ells presenten activitat nucleasa (RuvC i HNH)(44). Les dues cadenes petites d'ARN (crARN i tracrARN) de les quals el crRNA anellat a la proteïna *Cas9* gràcies a tracrARN, dirigeix a la mateixa cap a la seva diana de restricció. Un cop la pròpia *Cas9* ha reconegut la seqüència PAM (30), els dominis RuvC i HNH efectuen un doble tall a la cadena d'ADN(32). La *Cas9* també participa en el processat del crARN i en l'adquisició de l'espaiador, ja que s'ha observat que en seqüències CRISPR d'*S. pyogenes* silenciant el gen que codifica per la proteïna *Cas9* s'evita l'adquisició de nous espaiadors (45).

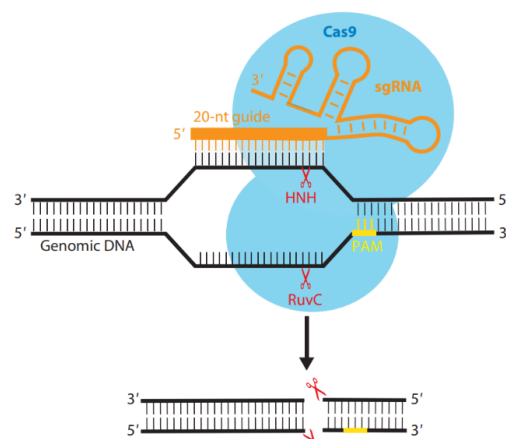
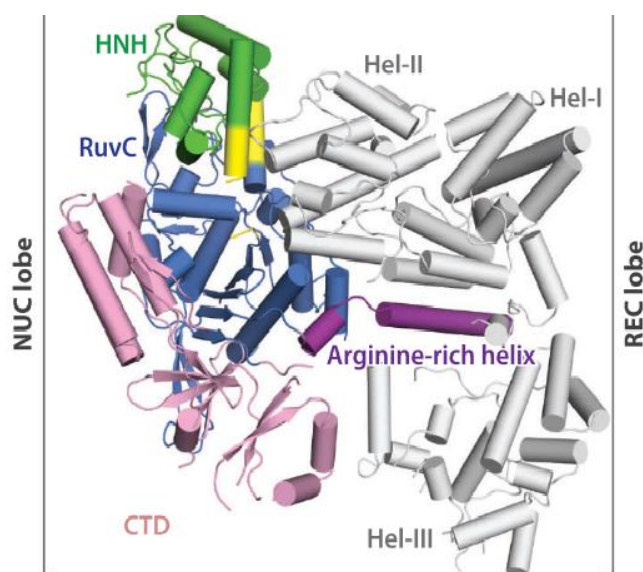


Figura 3. Esquema dels components del tall doble cadena per la proteïna Cas9(43).

En quant a la estructura de la proteïna *Cas 9* se sap que és una nucleoproteïna que en estat inactiu es poden observar dos lòbuls amb funcionalitats específiques el lòbul de reconeixement REC i el lòbul amb activitat nucleasa NUC, units per una hèlix rica en arginina (44).

El lòbul de reconeixement REC, està format per els dominis Hel I, Hel II i Hel III, i confereix a la proteïna *Cas 9* la capacitat de reconeixement, on l'ARN guia s'enllaça per posteriorment guiar la proteïna a la seva diana de restricció (32).

El lòbul NUC està format pels dominis HNH, RuvC i el domini C-terminal (CTD), els quals són els encarregats d'efectuar el tall de doble cadena a una distància de 3 pb en direcció 5' de la seqüència PAM, de forma que el domini HNH efectua un tall a la cadena complementària a l'ARN guia. D'igual forma el domini RuvC efectua el tall següent a la cadena oposada (46). El domini C-terminal del lòbul NUC no té activitat nucleasa sinó que té la capacitat d'interaccionar amb la seqüència PAM (43), la qual en la proteïna *SpyCas9* és una seqüència 5'-NGG-3' (47). Per tal de millorar l'especificitat d'aquestes seqüències PAM s'estudien les proteïnes *Cas* d'altres microorganismes com *Staphylococcus aureus* on *SaCas9* reconeix una seqüència 5'-NNGRRT-3' tot i que també es poden trobar variants en *Streptococcus mutans*, *Campylobacter jejuni*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli* o *Francisella novicida* (48).



**Figura 4.** Representació de l'estructura de la proteïna *SpyCas9* sense ARN guia, a partir d'un diagrama de Richardson (43).

#### 4.2.2 MAQUINÀRIA DE REPARACIÓ DE L'ADN I EL "KNOCKOUT" I "KNOCK-IN" GENÈTIC

La configuració de CRISPR que s'ha presentat en l'apartat anterior permet explicar un dels mètodes d'edició genètica, referit en anglès com "gene knockout". En aquest sistema curiosament, l'edició en sí no la causa directament la proteïna *Cas9* sinó que s'aprofita de la maquinària natural de reparació de danys a l'ADN, normalment activada per factors abiòtics de caràcter físic o químic (49). Es tracta d'un mecanisme de mutació similar al provocat per mètodes físics i químics, tot i que en aquest cas és biològic i responent a necessitats dissenyades amb antelació. Aquesta maquinària de reparació es tipifica principalment per dues vies d'actuació principals com són NHEJ (non-homolous end joining, traduït com recombinació no homologa) i HDR (Homology directed repair, traduït com recombinació homòloga) (50).

La via HDR es caracteritza per ser una mecanisme cel·lular conservatiu el qual utilitza seqüències homòlogues a les alterades de manera que, les que han patit un tall de doble cadena, es reparen sense pèrdues de funcionalitat, mentre que la NHEJ és més imprecisa i en diferents ocasions aporta deleccions o addicions de nucleòtids, provocant la pèrdua de funcionalitat del gen (50) (figura 5).

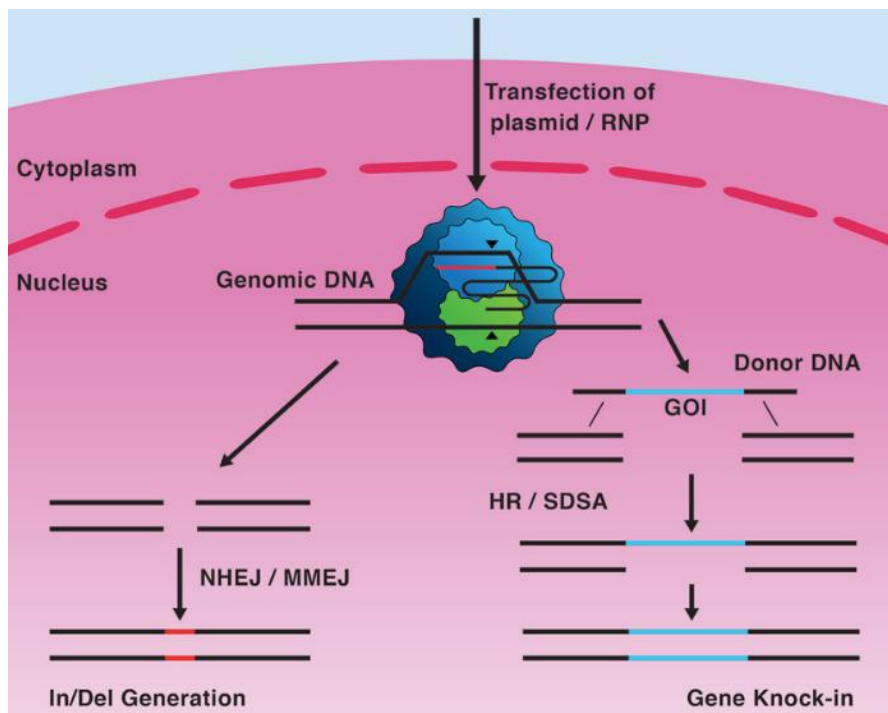


Figura 5. Esquema de les vies de reparació implicades en l'edició genètica mitjançant NHEJ i HDR, per efectuar un knockout o knock-in (51).

### 4.2.3 MODIFICACIONS DE LA PROTEÏNA CAS9: DCAS9

La proteïna *dCas9* a grans trets podem definir-la com la variació mutant de la proteïna *cas9* que ha perdut la seva activitat de produir el doble tall de cadena, alhora que manté la capacitat d'adherència d'interacció específica amb la seqüència d'ADN complementària (32). El fet de que *dCas9* no tingui activitat nucleasa ha fet possible obrir noves fronteres en l'edició genètica. Amb l'enginyeria de proteïnes s'ha aconseguit incloure factors de transcripció a la proteïna permetent edicions d'activació (CRISPRa) de gens inactius promovent la seva transcripció o silenciar-ne (CRISPRi) d'actius, evitant que els factors de transcripció natius puguin interaccionar amb la seqüència diana (52). Per a vegetals s'ha arribat a modificar la proteïna incloent-hi dominis com el SRDX del factor de transcripció ERF, per generar un inhibidor sintètic programable, o el domini EDLL i el domini activador TAL (TAD), per generar un activador programable, ambdós utilitzats amb èxit a l'hora de regular la transcripció en *Nicotiana benthamiana* (53). També es pot lligar a *dCas9* una proteïna que presenti fluorescència per tal d'utilitzar-la com a indicador de seqüències específiques visualitzat a la *Figura 7* (54).

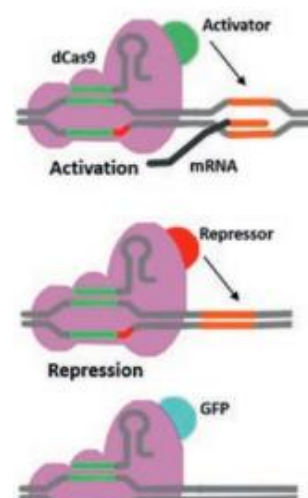


Figura 6. Sistemes *dCas9*.

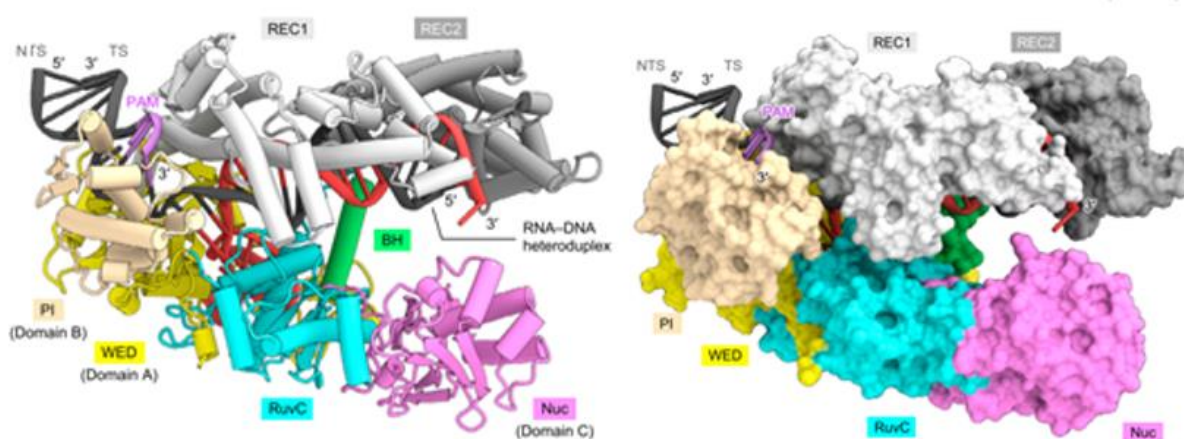
### 4.2.4 PROTEÏNA CPF1 (CAS12A)

Més recent que CRISPR *Cas9*, és CRISPR *cpf1* (CRISPR obtinguda de *Prevotella i Fancisella1*), que és una altra eina d'edició genètica (55), concretament classificada dins de la classe 2 tipus V-A (39). En comparació amb *Cas 9*, *Cpf1* difereix en varis aspectes: la seqüència PAM és 5'-TTTN-3', la qual ajuda a actuar en dianes riques en AT, complementant el sistema *Cas9* (amb PAM 5'-NGG-3'); *Cpf1* talla la cadena d'ADN formant segments esglaonats 5', possibilitant la substitució de gens mitjançant NHEJ; *Cpf1* talla l'ADN per regions llunyanes a la seqüència PAM, permetent a regions mutades anteriorment, ser tallades repetidament, promovent una homòlega (HDR). Tanmateix talls

repetitius juntament amb el processament d'extrems 5' esglaonats, pot promoure grans delecions cromosòmiques.

Un dels avantatges de *Cpf1* és la llargada del seu crARN, ~43nt, essent menys de la meitat que el del *Cas9* que a més no necessita un tracrARN a l'hora de processar les seqüències repetides en un crARN madur (56). Un altre avantatge que es suma al sistema *Cas12a* és el de l'edició genètica en múltiples locus amb un mateix crRNA (57).

En quant a l'estructura de *Cpf1*, aquesta és una proteïna amb diferents lòbuls que com a *Cas9* un dels lòbuls té funció de reconeixement (REC) format principalment per hèlix  $\alpha$ , el qual reconeix l'heterodúplex crARN-“target”. El lòbul REC està format per dos dominis: el REC1 format per 13 hèlixs  $\alpha$  i el REC2 format per 10 hèlixs  $\alpha$  i dues làmines  $\beta$ . El lòbul NUC està format pels dominis RuvC, WED, PI i Nuc els quals: PI interactua amb la seqüència PAM; Nuc i RuvC tallen la seqüència d'ADN formant un tall escalonat (59).



**Figura 7. Representacions complex proteïna AsCpf1-crRNA-Target DNA (59).**

## 5. EDICIÓ GENÈTICA EN FRUITERS

Per a la edició genètica en utilitzant les eines CRISPR disponibles s'han de seguir els següents passos. Primerament s'ha de triar la regió del gen d'interès a modificar que presenti seqüències PAM, tant en el cas de la *Cas9* (5'-NGG-3') com en *Cpf1* (5'-TTTN-3') (60). Un cop trobades aquestes seqüències es genera un ARN guia de ~20pb amb la seva seqüència trans activada formant el dúplex crARN:tracrARN juntament amb la proteïna ***Cas9*** (5). En cas de voler editar seguint l'estratègia HDR és necessari també afegir una seqüència homologa que serveixi de motlle per a la recombinació homòloga un cop hagin actuat les nucleases.

La introducció de les proteïnes i seqüències a les cèl·lules de les plantes, juntament amb els promotors mostrats a la **Taula 4** es fa mitjançant varis mètodes: la transformació per *Agrobacterium tumefaciens* (61) o l'edició mitjançant protoplasts (62). Un cop s'ha editat per via HDR o NHEJ es comproven els resultats dels organismes transformants transgènics mitjançant enzims de restricció o seqüenciació (63). Normalment, les generacions transgèniques presenten una àmplia varietat de mutacions o edicions al gen diana, tot i que en ocasions la generació T0 conté quatre tipus de genotips a les plantes diploides:

- 1 - Homozigòtic (mateixa mutació en dos al·lels).
- 2 - Heterozigòtic (mutació en un únic al·lel).
- 3 - Bial·lèlic (mutacions diferents en ambdós al·lels).
- 4 - Quimèric (mutacions no uniformes en tot l'organisme) (64).

En ocasions, fins i tot es pot trobar que no s'observin modificacions al no expressar-se suficientment les proteïnes *Cas* juntament amb les seqüències guia i per tant no apareguin mutacions (65). En apartats anteriors s'ha esmentat que el sistema CRISPR permet produir organismes editats genèticament sense adquirir ADN de forma externa. Tanmateix per



efectuar la primera edició mitjançant *Agrobacterium tumefaciens* es genera un primer organisme transgènic. Aquest, mitjançant segregació, pot reproduir-se en una nova generació on no adquireixi el transgen però que mantingui la mutació (66), fet que comporta una inversió de temps i per tant augment de cost d'assaigs per assolir l'organisme lliure de transgen. Per aquests tipus de mètodes neix la necessitat de desenvolupar mètodes on es pugui aconseguir l'edició sense necessitat d'inserir material genètic, com podria ser, per exemple, la transformació mitjançant nanopartícules (62).

Taula 4. Proteïnes Cas i promotors disponibles.

Nom	Origen	Funció	Referència
<b>Proteïnes Cas</b>			
StCas9	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Reconeix PAM ( 'NNAGAA' o 'NNGGAA' )	(67)
SaCas9	<i>Staphylococcus aureus</i>	Reconeix PAM ( 'NNGGGT' o 'NNGAA' )	(68)
SpCas9-VQR	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Reconeix PAM ( 'NGA' )	(69)
SpCas9-VRER	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Reconeix PAM ( 'NGA' )	(69)
Cas12a (Cpf1)	<i>Acidaminococcus sp. BV3L6 (As);</i>	Reconeix PAMs 'TTTN' o 'TTN'; reconeix ADN tallant en extrems cohesius; crARN més curt; poca activitat fora de la diana	(70)(57)(71)
	<i>Franciscella novicida (Fn)</i>		(72)
	<i>Lacnospiraceae bacterium ND2006 (Lb)</i>		
Cas13a (C2c2)	<i>Leptotrichia shahii</i>	Reconeix ARN monocatenari amb PFS d'A,U o C	(73)
nCas9	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Genera talls uncatenaris d'ADN	(74)
dCas9	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Dominis nucleasa inactius. Regulació transcripcional amb activació o repressió.	(53)
<b>Promotors</b>			
<b>Promotors Cas</b>			
YAO		Teixits amb divisió cel·lular activa incloent gemmes apicals, meristems, embrions, endosperma i pol·len	(75)
SPL		Cèl·lules esporogèniques i microesporòcits	(76)
EC1.1/EC1.2		Gàmets o embrions unicel·lulars	(77)
EF1a, hisH4		Teixit reproductiu i meristemàtic	(78)
MGE		Meiosis	(79)
DMC1		Meiòcit	(80)
RPS5A		En qualsevol etapa de desenvolupament	(81)

## 5.1 TOMATERA

La tomatera (*Solanum lycopersicum*), ha estat dins l'àmbit de l'enginyeria genètica un dels models de recerca més utilitzats. Això és degut a la seva simple herència diploide, cultiu eficient, cicle productiu curt i facilitat de transformació (82). La tomata va ser editada per primera vegada amb tecnologies CRISPR el 2014 silenciant el gen *Argonaute 7* resultant en fulles sense limbes o pecíols (83). A partir d'aquí s'han anat publicant articles sobre l'edició genètica de tomateres amb CRISPR, podent-se classificar en quatre grups: resistència a estrès biòtic, resistència a estrès abiòtic, millora de la qualitat del fruit i domesticació.

Com a qualitat del fruit podríem definir-les com millores organolèptiques (totes aquelles subjectes als sentits del consumidor), com el calibre, color, textura o gust. Qualitat nutricional en referència als nivells de nutrients del fruit (com sucres i vitamines) o compostos bioactius (licopè, antocianines i malat) que poden ser quantificats mitjançant anàlisi (84). Un dels principals gens que estan associats a l'augment del calibre en tomates són els que regulen la seva quantitat de lòculs, contribuent fins a un 50% de la variància de creixement (85), entre ells el gen *CLV3* que intervé en la via de senyalització *Clavata-Wuschel* responsable de la regulació de la taxa de replicació del teixit meristemàtic (86). S'ha observat que silenciant o regulant aquest gen es pot aconseguir un major nombre de lòculs i conseqüentment augment del calibre (85). En quant a color i textura també es pot actuar, on la percepció dels consumidors varia segons el país d'origen, per exemple, a les zones asiàtiques s'aprecia més un color rosat en contraposició al vermell europeu i americà (87). Actualment s'han aconseguit varietats modificades de color, groc (88), rosat (89) o púrpura (90), mitjançant les dianes *fitoen sintasa 1* (*PSY1*), *factor de transcripció MYB 12* (*MYB12*) i *l'antocianina 2* (*ANT2*). Deixant de banda factors visuals un altre atribut que afecta la qualitat comercial dels fruits és el fet de ser productes peribles i que per tant tenen data de caducitat. Una de les estratègies ha estat modificar el gen que regula la maduració del fruit (*RIN*) (91) o la DNA desmetilasa 2 (92), en fruits climatèrics, allargant el seu procés de maduració i augmentant la seva vida útil, però aquestes varietats difereixen dels originals per un menor color, gust i valor nutricional. Actualment han aconseguit avenços

sense perdre qualitats sensorials, un d'ells silenciant la *pectat liasa* (PL) i l'altre l'*alcobaca* (ALC).

Seguint amb la millora de qualitat de la tomata, una estratègia similar per obtenir noves varietats és la de domesticar varietats salvatges modificant gens que afectin principalment la seva morfologia (mida de la llavor o estructura de la planta) i fisiologia (temps de germinació, floració i maduresa) (93). Amb les tecnologies CRISPR és possible accelerar aquest procés.

Un dels trets interessants en producció agrícola que pot obtenir una varietat salvatge pel seu cultiu “de novo”, és la partenocàrpia (formació del fruit de forma asexual sense fecundació, i per tant sense llavor). En aquest sistema es possibilita l'estalvi de recursos de la planta a l'hora de formar les llavors i per tant millora el rendiment i així també evitar els processos de separació de llavors en certes preparacions (94). Un dels gens involucrats en la producció de noves varietats partenocàrpiques és el *agamous-like 6* (AGL6), el qual modificant-lo mitjançant un knockout amb CRISPR Cas9 permet la producció d'un mutant partenocàrpic que manté un bon rendiment sota estrès de calor (94). Una segona estratègia per a la producció de varietats partenocàrpiques és la d'actuar sobre la via de senyalització de l'auxina o l'increment dels nivells de gibberel·lina(95)(96). Dos grups d'investigació han treballat amb varietats salvatges observant quines característiques beneficioses podien mantenir alhora que les milloraven per poder fer-les varietats comercials. El primer aconsegueix resultats amb *Solanum pimpinellifolium* alterant la seva morfologia, mida, nombre de fruit per planta i valor nutricional dels fruits. En comparació amb el seu parent salvatge han aconseguit uns fruits el triple de grossos i una quantitat de fruits per planta deu vegades major amb un increment de la concentració de licopè del 500% (97). El segon grup de recerca, també amb *S. pimpinellifolium* ho ha fet editant seqüències codificants, regions cis reguladores, o marcs de lectura oberta associades amb floració i formació del fruit o amb la síntesi d'àcid ascòrbic(98). Per acabar amb la domesticació de la tomatera, també s'ha aconseguit una tomata que presenta un temps de floració i formació del fruit menor a l'original, silenciant el gen *Self-pruning 5G* (SP5G) per modificar la seva sensibilitat al fotoperíode (99).

En quant a estres biòtic, el podem definir com afectació per un agent d'origen biològic tipus microorganisme que causa una malaltia a la planta, ja sigui d'origen viral, bacterià, fúngic o d'insectes (100). Des de ben recent del desenvolupament de les tecnologies

CRISPR Cas9 ja s'han anat publicant articles sobre edicions enfocades a estratègies de millora des d'un punt de vista de resistència a l'estrès biòtic. Les estratègies plantejades actualment per afrontar infeccions víriques són principalment dues: la primera consisteix en dissenyar els sgRNAs per actuar directament a l'ADN viral i la segona en modificar els propis gens de la tomata per conferir-li aptituds antivíriques (101). S'han aconseguit resultats amb el virus de la cullera del tomàquet (*tomato yellow leaf curl virus TYLCV*) dissenyant dianes per actuar en proteïnes de la càpsida vírica i el locus replicasa (102). La varietat obtinguda de tomatera presenta major interferència vírica i conseqüentment menys ADN viral acumulat que el no modificat i una immunitat activa durant múltiples generacions, demostrant que amb CRISPR es poden aconseguir varietats resistents al virus. Tanmateix els virus no són els únics patògens que afecten a la tomatera perquè els fongs són causants de multitud de malalties entre elles: l'oïdi o el míldiu, causen pèrdues productives i qualitatives importants (103). Darrerament s'ha observat que inactivant el gen *downy mildew resistant 6 (DMR6)* es millora la resistència davant varis patògens com *Pseudomonas syringae*, *Phytophthora capsici* o *Xanthomonas* spp. sense observar efectes perjudicials (104). En quant a l'oïdi s'ha observat que modificant el gen *mildew resistant locus O 1 (Mlo1)*, que codifica per una proteïna de membrana, el fet d'inactivar-lo confereix una total resistència a *Oidium neolycopersici*, on a més a més per autoreplicació s'han aconseguit descendents sense ADN-T i per tant una varietat lliure de transgèn (105). Un resultat similar és el de la inhibició del gen *Powdery mildew resistance 4 (PMR4)* que codifica per una callosa sintasa, que confereix també resistència a *O. neolycopersici* (106). Com a les estratègies anteriors, també s'ha observat que és possible conferir resistència a la tomata a *Botrytis cinerea* modificant el gen *Mitogen-activated protein kinase 3 (MAPK3)*(107).

Tanmateix els cultius no només s'exposen a perills d'origen biològic sinó que també poden patir efectes adversos davant dels abiòtics on podem englobar la climatologia (sequeres, excés de pluja, calor o temperatures excessivament baixes), juntament amb els perills químics (108).

Hi ha dos gens que són d'especial interès per desenvolupar tomates amb major resistència a temperatures baixes, que com a cultiu són especialment susceptibles a patir-hi danys, un és el *C-repeat binding factor 1 (CBF1)* el qual s'ha observat que el seu *knockout* provoca una major susceptibilitat a patir danys per fred (109) juntament amb el *brassinazole resistant 1 (BZR1)* el qual està relacionat a la termotolerància com a regulador

dels gens *feronia* (*FER*) (110). El gen *MAPK3* esmentat ja anteriorment pel seu efecte protector davant la podridura gris causada per *B. cinerea* també està relacionat amb la resposta de la tomatera davant un ambient de sequera, protegint les membranes cel·lulars d'un estrès oxidatiu(111).

## 5.2 CÍTRICS



**Figura 8. Lesions per cancosi asiàtica a fruits inmadurs.**  
(114)

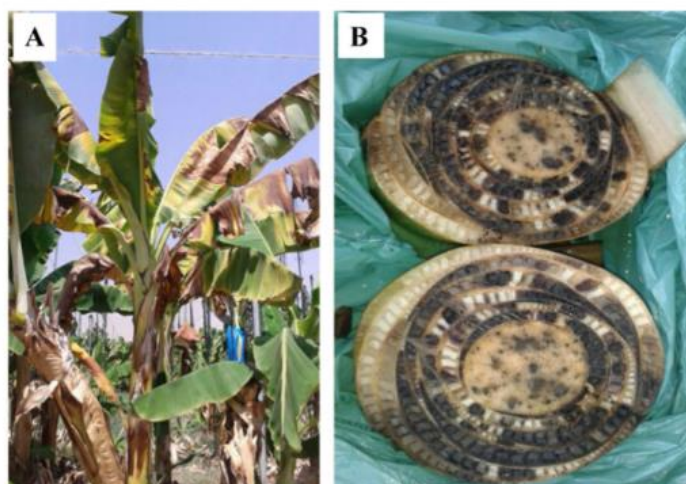
Els cítrics són un dels cultius fruiters més importants a nivell mundial. Tanmateix la modificació mitjançant cultiu selectiu o la manipulació genètica és molt complicada degut a tenir llavors amb poliembrionies, incompatibilitat del pol·len, fruits partenocàrpics o per desenvolupar-se en una fase juvenil llarga (112). La primera modificació amb tecnologies CRISPR a cítrics es va fer el 2014 utilitzant com a objectiu la resistència a *Xanthomonas citri subsp. citri* (*Xcc*), causant de la cancosi asiàtica dels cítrics. Es va realitzar mitjançant

agroinfiltració, on s'introdueixen les seqüències per la *Cas9* i els sgARN amb l'objectiu de modificar el gen *PDS* de les fulles de la taronja dolça i l'aranja. L'assaig va ser un èxit tot i que presenta un baix percentatge de mutació de les fulles infiltrades (113). Per part del mateix grup, mitjançant la transformació per *Agrobacterium* dels epicòtils d'aranja, es van crear 6 línies transgèniques que contenien les seqüències CRISPR/Cas9 per la modificació del gen *CsLOB1*, resultant en plantes homozigòtiques amb una resistència augmentada al xancre (**Figura 8.** (114)). De les 6 línies obtingudes cada una mostrava diferents graus de resistència al xancre(115). Posteriorment s'utilitza la mateixa estratègia amb *Cpf1* on tots els individus editats presentaven delecions demostrant que *Cpf1* també es pot utilitzar per editar cítrics(116). D'aquesta manera es pot esperar que CRISPR per millorar els rendiments productius dels cítrics mitjançant la resistència a infeccions, com les més

importants actualment com el *citrus greening* o *Huanglongbing* causat pel bacteri *Candidatus Liberbacter asiaticus* o la clorosi variegada dels cítrics causada per *Xylella fastidiosa*.

### 5.3 PLÀTANERA

Els plataners, un dels cultius fruiters més importants de la zona del tròpic(117), són un cultiu difícil de modificar degut al seu genoma triploide(118). Tot i així el 2017 un grup d'investigació dissenya un sistema CRISPR amb target els gens RAF-PDS1 i RAF-PDS2. Aquestes edicions es dissenyen per la via NHEJ provocant insercions i delecions de les seqüències objectiu les quals codifiquen per l'enzim *PDS* (de l'anglès phytoene desaturase). La *PDS* és un enzim necessari per la ruta metabòlica de biosíntesi de carotenoides, fet que permet observar de forma clara els resultats ja que la seva inhibició resulta en fenotips albins. L'assaig aconseguix una detecció de mutacions de fins a un 59% de les plantes regenerades(119) demostrant que el sistema CRISPR Cas9 és efectiu en la manipulació genètica del plàtan. Posteriorment, amb un disseny similar, es va publicar un estudi amb la varietat Cavendish. Aquest nou assaig es dissenya enfocant-se en la diana d'un exó del gen que codifica la *PDS*. Tot això amb uns resultats exitosos del 100% amb les 19 plantes regenerades(120).



**Figura 9.** Simptomatologia externa d'infecció per *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* (raça TR4)(121).

En aquest últim any hi ha varis equips d'investigació que estan mirant de millorar la resistència del plàtan a la infecció del fong *Fusarium oxysporum f. sp. cubense tropical race 4* (Foc TR4) **Figura 9** (121) mitjançant l'activació d'un gen en estat latent o inactivant els que el fan més vulnerable a la infecció (122). Actualment existeix una varietat de plàtan

transgènic resistent al TR4, obtinguda per enginyeria genètica convencional, però amb la possibilitat d'evitar les barreres reguladores que afecten als organismes transgènics converteixen les tecnologies CRISPR en una de les possibles tecnologies per salvaguardar-les i poder assolir el mercat més fàcilment (122).

### 5.4 POMERA

En pomera com a la resta de fruiters quan, es comença a assajar amb CRISPR Cas es fan estudis inicials sobre la viabilitat de la tècnica. Els primers estudis en poma es van fer el 2016, inhibint el gen encarregat de la síntesi de l'enzim PDS. En aquest estudi al regenerar els organismes modificats amb quatre ARN guia diferents, es va observar que en un d'ells presentava un 13.6% el fenotip clarament albí essent el primer estudi que demostra que és possible l'edició genètica de la pomera (123). Al mateix any un equip comença a estudiar la possibilitat d'oferir resistència al bacteri *Erwinia amylovora* responsable de la malaltia fire blight o foc bacterià **Figura 10** (124) editant amb CRISPR Cas9 els gens DIPM-1 i DIPM-2 tot utilitzant el mètode de transformació per protoplasts. Es tracta de la primera modificació genètica en pomes que no insereix nous gens sinó que transfereix directament les ribonucleoproteïnes (RNPs) i material necessari per fer les edicions (125). Des de llavors fins ara s'ha estat treballant per augmentar l'eficiència de transformació dels sistemes CRISPR Cas en poma ja que els inicials són massa baixos (64).





**Figura 10. Síntomes foc bacterià en *Malus micromalus* L. (129)**

mètode de camp ràpid i alternatiu on la seva versatilitat rau en poder actuar sobre la infecció de seguida (128).

Una de les estratègies actuals de l'edició genètica per tal d'adquirir resistència a malalties és la d'actuar amb les proteïnes responsables d'interactuar entre la planta i el patògen(126). En aquest àmbit l'article mencionat anteriorment sobre el foc bacterià i més recentment publicat amb el target DIPM4 de les varietats Golden delicious i Gala, una supressió d'un sol gen en augmentar substancialment la resistència a *Erwinia amylovora*(127). També s'ha desenvolupat un sistema de detecció del virus del mosaic de la pomera mitjançant CRISPR Cas12a, i es tracta d'un nou

## 5.5 VINYA

El raïm és el fruit obtingut de la *Vitis vinifera* cultiu molt important per a l'elaboració de suc, vi o mermelades. És un cultiu del que s'ha seqüenciat el seu genoma complet, possibilitant estudiar seqüències d'interès i la seva funcionalitat per millorar els seus atributs de cultiu (129). Un dels estudis sobre les possibles seqüències d'interès el 2016, s'observen un total de 35.767.960 de seqüències **PAM** de les quals el 67.18% del total formen part de seqüències codificants (130). Per tant és possible editar el raïm mitjançant CRISPR Cas9 de forma eficient, on curiosament les fulles més velles presenten una raó de modificació major (131). S'ha observat també que modificant el gen PDS (Phytoene Desaturase) resulta en individus albins com amb altres fruiters (132).

En quant a possibles edicions per millorar el cultiu de raïm s'ha observat que el factor de transcripció WRKY52 està involucrat en la resposta de *Vitis vinifera* a estrès biòtic,

concretament mutacions bial·lèliques responen millor a la infecció per *Botrytis cinerea* (133) **Figura 11**(134).



**Figura 11. Infecció per *Botrytis cinerea* (135).**

## 5.6 SÍNDRIA

La síndria es suma a les fruites que es poden editar amb les tecnologies CRISPR Cas, concretament la **CRISPR Cas9**, modificant altra vegada el gen **PDS**. De l'assaig realitzat per un grup de recerca, quasi tots els transformants presentaven les edicions del gen PDS. En conseqüència l'eficiència va ser propera al 100% i amb una absència d'efectes no diana (135). Posteriorment el mateix equip d'investigació tria com a gen diana el de la acetolactat sintasa (ALS) (136), i demostren que mutacions puntuals en aquest gen confereixen resistència a herbicides en diferents espècies de plantes (137). L'estudi utilitza una **dCas9** a la qual se li integra una deaminasa de citosina la qual substitueix una citosina per una timina. Les plantes mutades presenten resistència a l'herbicida tribenuron (136).

En estudis anteriors duts a terme en *Arabidopsis thaliana* es va observar que la fitosulfoquina o hormona peptídica vegetal (PSK) atenua la resposta immunitària de les plantes (138). Aquest últim any s'ha publicat un article on mitjançant la proteïna **Cas9** s'edita el gen diana *Clpsk1* el qual codifica per la PSK resultant en llavors de síndria més resistents a la infecció per *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* (139) **Figura 12**(140).



**Figura 12.** Síndria amb lesió necrosada de la tija i decoloració vascular per *Fusarium*. (141)

## 5.8 MADUIXERA

Recentment la maduixa, *Fragaria vesca*, s'ha començat a utilitzar com a model experimental degut a la seva genètica diploide tot en vista a aplicar els resultats en un futur amb el maduixot *Fragaria x ananassa*, que és una varietat octaploide (141), i per tant més complicada de modificar. El sistema CRISPR Cas demostra ser útil a l'hora d'editar genèticament *Fragaria vesca*, concretament al editar el gen TAA1 i la seqüència promotora ARF8 responsables de la via de síntesi d'auxina amb un percentatge d'eficiència que va del 49 al 75% (142). Per comprovar que les edicions es transmetien, es va observar la primera generació de les plantes editades. On s'observa que succeixen noves mutacions amb una alta eficiència (83% en T<sup>1</sup> i 49% en T<sup>0</sup>) incloent grans delecions a les seqüències PAM i un creixement més ràpid de les llavors de les plantes que presentaven “knockouts” homozigòtics de l'ARF8(142).

Més recentment s'ha provat d'editar el maduixot *Fragaria x ananassa* per comprovar la funcionalitat del gen TM6 el qual ha estat editat eficientment. A l'assaig es veu que el gen TM6 desenvolupa una funció important a l'hora de formar les anteres on les varietats mutants eren infèrtils i per tant no produïen fruits (143). Aquest últim estudi és interessant ja que mostra com CRISPR és una eina útil a l'hora de conèixer millor la funcionalitat de gens encara desconeguts.

## 6. CONCLUSIONS

Des de la reprogramació de la proteïna Cas9 formant el sistema CRISPR/Cas9, aquest i els seus derivats, s'han anat adaptat molt bé dins els assajos d'enginyeria genètica en vegetals. I es que no només ha tingut èxit per l'alta especificitat del mètode, sinó que alhora és més simple i presenta un cost reduït tant econòmicament com en temps dedicat al procés experimental. Encara que aquests avantatges han fet que CRISPR destaquí per sobre altres tecnologies d'edició genètica com són les TALENs o ZFN, encara es va millorant any rere any la seva precisió i eficiència. Actualment s'està investigant per millorar el sistema de transformació dels organismes, és a dir com es fa arribar el sistema CRISPR/Cas9 dins l'organisme transformant, per poder generar varietats sense transgen més ràpidament.

Tot i que inicialment els estudis es centraven dins d'un àmbit mèdic, la informació sobre l'aplicació d'aquestes tecnologies en vegetals dedicats a la producció d'aliments ha anat en augment. Actualment ens trobem amb la necessitat de produir noves varietats que presentin atributs agronòmics que ajudin a afrontar les adversitats climàtiques i patogèniques que vagin apareixent en el futur. CRISPR ha demostrat ser capaç de produir varietats per evitar malalties d'origen biològic, dotant d'una estratègia complementària a l'ús de fitosanitaris. S'han aconseguit modificacions amb major resistència a malalties en tomatera, cítrics, platanera, pomera, vinya i síndria. També s'ha desenvolupat un mètode amb CRISPR/Cas12 capaç de detectar infeccions víriques i així poder actuar a temps un cop la planta presenti la malaltia.

És important tenir en compte que garantir la producció en front a malalties no és la única necessitat de les produccions actuals. La producció de noves varietats també hi engloba millorar la qualitat de les fruites. En aquest sentit la tomatera, al ser organisme model ens permet observar quines modificacions es podrien donar en altres fruiters en un futur. Algunes d'aquestes modificacions són les d'aconseguir fruits amb colors més comercials segons el país d'origen a què vagin destinats, majors calibres o formació de fruits partenocàrpics. En definitiva, amb el constant creixement de CRISPR s'espera que les seves aplicacions en la producció d'aliments d'origen vegetal vagi en augment.

## 7. ANNEXES

## 7.1 VARIETATS DE FRUITA OBTINGUES MITJANÇANT MÈTODES FÍSICS I QUÍMICS DE MUTAGÈNESI

Taula 5. Varietats de fruita aprovades o pendents d'aprovació obtingudes per mutagènesi física i química.<sup>3</sup>

Varietat	Origen	Any	Nom científic	Nom comú	Descripció breu efectes
Shiro-mogi	Japó	1981	<i>Eriobotrya japonica Lindl</i>	Nesprer del Japó	Irradiació de llavors amb rajos gamma (200 Gy). Atributs de la varietat mutant són: Fruits més grans i saborosos.
Zyrianka	Russia	1985	<i>Hippophaea rhamnoides L.</i>	Fràngula	Tractament combinat amb rajos gamma (150 Gy) i N-nitroso-N-metilurea (NMU) (0.01%). Atributs varietat mutant rendiments majors, major contingut en oli, sucre, àcid ascòrbic i carotenoides.
Dao tien	Vietnam	1986	<i>Ziziphus mauritiana Lam.</i>	Ginjoler	Desenvolupada per germinació de llavors amb mutagen químic N-metil-N'-nitrosoarea MNH. Atributs de la varietat mutant són: Maduració primerenca , 2 cultius/any, major calibre del fruit i millora del gust (aroma préssec).
Ma hong	Vietnam	1986	<i>Ziziphus mauritiana Lam.</i>	Ginjoler	Desenvolupada per germinació de llavors amb mutagen químic N-metil-N'-nitrosoarea MNH. Atributs de la varietat mutant són: Maduració primerenca , 2 cultius/any, Fruits rodons (ovalats anteriorment), color rosat, gust més dolç, rendiment productiu més estable.

## 7 Annexes

Novaria	Malasia	1995	<i>Musa sp.</i>	Banana	Irradiació amb rajos gamma (60 Gy). Atributs de la varietat mutant són: maduració primerenca i major quantitat de fruits.
Magnif 135	Argentina	1968	<i>Prunus persica L.</i>	Préssec	Irradiació crònica de rajos gamma recuperada d'un arbre exposat el 1963, identificat el 1966 i propagat posteriorment. Atributs de la varietat mutant són: Major fruit, maduresa primerenca (7 dies) i un color vermell més profund.
Golden Haidegg	Àustria	1986	<i>Malus pumila Mill.</i>	Poma	Irradiació de rajos gamma (50 Gy) de brots en estat latent. Atributs de la varietat mutant són: Calibre fruit major, maduresa fruit concentrada, sense russeting, fruits llisos i brillants, major vida útil en fred (dues setmanes), millor gust i color groc amb traces vermelloses.
Plovdiv 6	Bulgària	1981	<i>Prunus persica L.</i>	Préssec	Irradiació del pol·len amb rajos gamma (10 Gy). Atributs de la varietat mutant són: Major rendiment productiu, calibre major, millora qualitat i maduració mitjana-primerenca.
Shamrock	Canadà	1986	<i>Malus pumila Mill.</i>	Poma	Hibridació amb varietat mutant obtinguda per radiació. Atributs de la varietat mutant són similars a la "Granny Smith, però 6 setmanes abans, creixement del fruïter més favorable i cultiu en regions nòrdiques.
McIntosh 8F-2-32	Canadà	1970	<i>Malus pumila Mill.</i>	Poma	Irradiació rajos gamma. Atributs de la varietat mutant són: millora del color, resistència a <i>Podosphaera leucotricha</i> (Oïdi) i <i>Venturia inaequalis</i> (ronya de les pomes).

7 Annexes

Early Blenheim	Canadà	1970	<i>Prunus armeniaca L.</i>	Albercoc	Tractament de brots latents amb neutrons tèrmics (thN). Atributs de la varietat mutant són: maduració primerenca (una setmana abans que el progenitor), rendiment anual, calibre major i pol·len auto compatible.
Compact Lambert	Canadà	1964	<i>Prunus avium L.</i>	Cirera dolça	Irradiació de brots latents amb rajos-x (40 Gy). Atributs de la varietat mutant són: creixement nan i compacte del fruïter, maduresa primerenca i alt rendiment però fruit més petit.
Compact Stella	Canadà	1974	<i>Prunus avium L.</i>	Cirera dolça	Irradiació de brots latents per rajos x (40 Gy). Atributs de la varietat mutant són: semi nanisme, gran estimulació creixement, auto fèrtil.
Lapins	Canadà	1983	<i>Prunus avium L.</i>	Cirera dolça	Hibridació amb varietat mutant (Stella) obtinguda mitjançant raigs x. Atributs de la varietat mutant són: Major calibre fruits, rígida, madura uns 2 dies tard, auto fèrtil, més productiu que varietats comercials.
Stella	Canadà	1968	<i>Prunus avium L.</i>	Cirera dolça	Hibridació amb la varietat auto fèrtil John Innes Seedling 2420 obtinguda al irradiar pol·len per rajos x. Atributs de la varietat mutant són: millora de qualitat del predecessor.
Sunburst	Canadà	1983	<i>Prunus avium L.</i>	Cirera dolça	Hibridació amb varietat Stella obtinguda per rajos x. Atributs de la varietat mutant són: major calibre, resistència a trencaments per pluja, non creixement, auto fèrtil, molt productiva.



## 7 Annexes

Xuegan 9-12-1	Xina	1983	<i>Citrus sp.</i>	Taronja	Irradiació de les gemmes de les branques amb rajos gamma (100 Gy). Atributs de la varietat mutant són: quasi sense llavors, alt rendiment i partenogènesi.
Hongju 418	Xina	1983	<i>Citrus sp.</i>	Taronja	Irradiació de branques per rajos gamma (100 Gy). Atributs de la varietat mutant són: quasi sense llavors, gran rendiment gust dolç.
Hongju 420	Xina	1986	<i>Citrus reticulata Blanco</i>	Mandarina	Irradiació de llavors per rajos gamma (100 Gy). Atributs de la varietat mutant són: quasi sense llavors i resistència a temperatures baixes.
Donghenghongpingguo	Xina	1987	<i>Malus sp.</i>	Poma	Irradiació per rajos gamma (250 Gy). Atributs de la varietat mutant són: millora estructural i atributs agronòmics.
Fuxiangyanghongdli	Xina	1983	<i>Pyrus communis</i>	Pera	Irradiació per rajos gamma. Atributs de la varietat mutant són: resistència malalties bacterianes i bona qualitat per cuina.
Chaofu 1	Xina	1989	<i>Pyrus communis</i>	Pera	Irradiació per rajos gamma. Atributs de la varietat mutant són: millora estructural i qualitat per cuina
Chaofu 2	Xina	1989	<i>Pyrus communis</i>	Pera	Irradiació per rajos gamma (2.5 Gy). Atributs de la varietat mutant són: Millora atributs agronòmics i qualitat cuina.
Chaofu 10	Xina	1989	<i>Pyrus communis</i>	Pera	Irradiació per rajos gamma (2.5 Gy). Atributs de la varietat mutant són: millora atributs agronòmics i qualitat per cuina.

7 Annexes

Chaofu 11	Xina	1989	<i>Pyrus communis</i>	Pear	Irradiació per rajos gamma (2.5 Gy). Atributs de la varietat mutant són: millora maduració i bona qualitat per cuina.
Zhongyu 7	Xina	1985	<i>Citrus sp.</i>	Taronja/mandarina	Irradiació per rajos gamma. Atributs de la varietat mutant són: millora en producció de llavors i bona qualitat per cuina.
Zhongyu 8	Xina	1985	<i>Citrus sp.</i>	Taronja/mandarina	Irradiació per rajos gamma. Atributs de la varietat mutant són: Millora producció de llavors i bona qualitat per cuina.
Courtagold	França	1972	<i>Malus pumila Mill.</i>	Poma	Irradiació per rajos gamma. Atributs de la varietat mutant són: reducció dràstica de l'arbre fruiter, principalment per internodes curts, utilitzada per plantes de jardí.
Courtavel	França	1972	<i>Malus pumila Mill.</i>	Poma	Irradiació per rajos gamma. Atributs de la varietat mutant són: reducció dràstica arbre fruiter, principalment per internodis curts, utilitzada principalment per jardí.
Burga	França	1979	<i>Ribes nigrum L.</i>	Grosella negra	Irradiació per rajos gamma. Atributs de la varietat mutant són: maduresa primerenca, extensió del temps de collita i processament.
Belrene	França	1970	<i>Malus pumila Mill.</i>	Poma	Tractament dels brots per mutagen químic metanosulfonat d'etil (EMS). Atributs de la varietat mutant són: maduresa primerenca, major calibre i intensitat de color, rendiment reduït.
Blackjoin BA 2 520	França	1970	<i>Malus pumila Mill.</i>	Poma	Irradiació d'arbres latents per radiació gamma (50 Gy). Atributs de la varietat mutant són: millora de tonalitat i regularitat de color vermell.

7 Annexes

Lysgolden	França	1970	<i>Malus pumila Mill.</i>	Poma	Irradiació de brots latents per rajos gamma (50 Gy). Atributs de la varietat mutant són: sense russeting, qualitat de fruit i rendiment productiu reduït.
Westra	Alemanya	1968	<i>Ribes sp.</i>	Grosella vermella	Irradiació (15 Gy). Fort creixement vertical.
Burlat C1	Itàlia	1983	<i>Prunus avium L.</i>	Cirera dolça	Irradiació de brots per rajos gamma. Atributs de la varietat mutant són: hàbit de creixement compacte (70-80%).
Nero II C1	Itàlia	1983	<i>Prunus avium L.</i>	Cirera dolça	Irradiació de brots latents per rajos gamma. Atributs de la varietat mutant són: hàbit de creixement compacte (45-60%).
Ferrovía spur	Itàlia	1992	<i>Prunus avium L.</i>	Cirera dolça	Irradiació de gemmes latents de Ferrovía amb rajos x (4 Gy) . Atributs de la varietat mutant són: arbre compacte, maduració primerenca i alt rendiment.
Senbatsu-Fuji-2-Kei	Japó	1985	<i>Malus pumila Mill.</i>	Poma	Irradiació de brots latents amb rajos gamma (60+30 Gy). Atributs de la varietat mutant són: color vermell excel·lent.
Gold Nijisseiki	Japó	1990	<i>Pyrus pyrifolia Nakai</i>	Pera Japonesa	Irradiació crònica a la varietat 'Nijisseiki' per rajos gamma (0.12-0.15 Gy diaris). Atributs de la varietat mutant són: Millora la susceptibilitat a <i>Dilocarpon rosae</i> causant de la taca negra.
Kotobuki Shinsui	Japó	1996	<i>Pyrus pyrifolia Nakai</i>	Pera Japonesa	Irradiació crònica de rajos gamma (80 Gy). Atributs de la varietat mutant són: Millora la resistència a la taca negra.
Klue Hom Thong KU1	Tailàndia	1985	<i>Musa sp.</i>	Banana	Irradiació d'un cultiu de teixits per rajos gamma (25 Gy). Atributs de la varietat mutant són: feixos més grans.

## 7 Annexes

Star Ruby	Estats Units	1970	<i>Citrus paradisi Macf.</i>	Aranja	Tractament amb neutrons tèrmics (thN). Atributs de la varietat mutant són: reducció dràstica llavors.
Rio Red	Estats Units	1984	<i>Citrus paradisi Macf.</i>	Aranja	Tractament amb neutrons tèrmics (thN). Atributs de la varietat mutant són: Fruit i most de color vermell més profund i gran adaptabilitat.
Bol (Abundant)	Russia	1979	<i>Ficus carica L.</i>	Figa	Irradiació amb rajos gamma (50-70 Gy).
Karlik Samorodka	Russia	1979	<i>Prunus cerasus L.</i>	Cirera àcida	Irradiació amb rajos gamma. Atributs de la varietat mutant són: nanisme.
Plodorodnaya Michurina	Russia	1977	<i>Prunus cerasus L.</i>	Cirera àcida	Irradiació amb rajos x. M Atributs de la varietat mutant són: llavors sense pol·linització
Polukarlik Orlovskoi Rannei	Russia	1979	<i>Prunus cerasus L.</i>	Cirera àcida	Irradiació amb rajos gamma. Atributs de la varietat mutant són: semi nanisme.
Polukarlik Turgenevki	Russia	1979	<i>Prunus cerasus L.</i>	Cirera àcida	Irradiació amb rajos gamma. Atributs de la varietat mutant són: semi nanisme.
Karabakh	Russia	1979	<i>Punica granatum L.</i>	Magrana	Irradiació amb rajos gamma (50-70 Gy).
Khyrda	Russia	1979	<i>Punica granatum L.</i>	Magrana	Irradiació amb rajos gamma (50-70 Gy). Atributs de la varietat mutant són: nanisme

7 Annexes

Colocolchnik	Rússia	1991	<i>Rubus idaeus L.</i>	Gerd	Tractament de solució aquosa al 0.025% de N-nitrosoetilurea (NEU). Atributs de la varietat mutant són: Resistència a malalties i baixes temperatures (-30 °C).
Spurdente-Ferco	França	1988	<i>Prunus domestica L.</i>	Pruna	Irradiació amb rajos gamma. Atributs de la varietat mutant són: maduració primerenca (10 dies abans que ENTE 707), auto compatible, millora de branques i localització dels fruits.
Dovar	Països Baixos	1978	<i>Malus sp.</i>	Poma	Irradiació de la varietat John Downie amb rajos x (30-35 Gy). Atributs de la varietat mutant són: fulles variades.
Valencia 2 INTA	Argentina	1987	<i>Citrus sinensis L. Osbeck</i>	Taronja	Irradiació amb rajos x (20 Gy). Atributs de la varietat mutant són: productivitat i qualitat de fruits.
Eureka 22 INTA	Argentina	1987	<i>Citrus limon L. Burm.</i>	Llimona	Irradiació amb rajos x (10 Gy). Atributs de la varietat mutant són: rendiment i qualitat dels fruits.
Gibrid 218	Rússia	1984	<i>Citrullus lanatus Mansf.</i>	Síndria	Irradiació de llavors híbrides amb rajos gamma (500 Gy). Pedigree: [Bykovskii 22 x Melitopolskii 143 i creuament subseqüent cross amb Yubileinyi 72].
Sumste Samba	Canadà	2000	<i>Prunus avium L.</i>	Cirera dolça	Irradiació amb rajos gamma. Atributs de la varietat mutant són: temps maduresa mitjana.
Mori-hou-fu 3A	Japó	1963	<i>Malus pumila Mill.</i>	Poma	Irradiació amb rajos gamma (30 Gy). Atributs de la varietat mutant són: major resistència a malalties.
Osa Gold	Japó	1995	<i>Pyrus pyrifolia Nakai</i>	Pera Japonesa	Irradiació crònica de rajos gamma (40m de la font del centre d'explotació). Atributs de la varietat mutant són: resistència a la taca negra.

## 7 Annexes

Fuku-ekubo	Japó	1994	<i>Prunus persica L.</i>	Préssec	Irradiació per rajos gamma (30 Gy). Atributs de la varietat mutant són: maduresa primerenca.
Shimizu Hakutou RS	Japó	2004	<i>Prunus persica L.</i>	Préssec	Irradiació per rajos gamma. Atributs de la varietat mutant són: resistència a la taca negra
Shaji 1	Xina	1985	<i>Prunus persica L.</i>	Préssec	Tractament amb làser de CO <sub>2</sub> . Atributs de la varietat mutant són: alt rendiment, madura tardana i bona qualitat.
Shaji 2	Xina	1985	<i>Prunus persica L.</i>	Préssec	Tractament amb làser de CO <sub>2</sub> . Atributs de la varietat mutant són: bons rendiments i qualitat i maduració primerenca.
Shaji 1	Xina	1985	<i>Prunus persica L.</i>	Préssec	
Van 2D-14-11	Canadà	1972	<i>Prunus avium L.</i>	Cirera dolça	Radiació de brots latents amb rajos x (40 Gy). Atributs de la varietat mutant són: arbre de mida reduïda altament estimulat.
Lambert 2B-17-18-EC	Canadà	1972	<i>Prunus avium L.</i>	Cirera dolça	Irradiació amb rajos x (50 Gy). Atributs de la varietat mutant són: menys branques, compacte, arbre robust i lleugerament més petit que la varietat Lambert.
Stella 16A-7	Canadà	1972	<i>Prunus avium L.</i>	Cirera dolça	Irradiació mitjançant rajos x (40 Gy). Atributs de la varietat mutant són: creixement nan, auto fèrtil, planta no destinada a producció.
Super 6	Japó		<i>Prunus avium L.</i>	Cirera dolça	Cultiu in vitro exposat a mutagen químic colquicina. Atributs de la varietat mutant són: branques gruixudes, pètals rodons i fulles més grans.

## 7 Annexes

Roman Nishiki	Japó	1998	<i>Prunus avium L.</i>	Cirera dolça	Exposició a mutagen químic colquicina. Atributs de la varietat mutant són: fulles més grans, adherència mitjana entre llavor i pell.
Natsu-hime	Japó	2004	<i>Ananas comosus</i>	Pinya	Irradiació crònica de rajos gamma. Atributs de la varietat mutant són: color de la fulla.
Shin-Nyohou	Japó	1989	<i>Fragaria x ananassa</i>	Maduixa	Mutació somaclonal en formació del call. Atributs de la varietat mutant són: collita primerenca i alt rendiment.
Akita Berry	Japó	1992	<i>Fragaria x ananassa</i>	Maduixa	Mutació somaclonal de cultiu meristemàtic. Atributs de la varietat mutant són: Major resistència a <i>Alternaria alternata</i> .
Anteher	Japó	1994	<i>Fragaria x ananassa</i>	Maduixa	Mutació somaclonal en un altre cultiu. Atributs de la varietat mutant són: maduració primerenca.
Himatsuri	Japó	1995	<i>Fragaria x ananassa</i>	Maduixa	Mutació somaclonal de cultiu meristemàtic. Atributs de la varietat mutant són: fruit vermell brillant en polpa i pell.
Smile Heart	Japó	1998	<i>Fragaria x ananassa</i>	Maduixa	Mutació somaclonal en cultiu. Atributs de la varietat mutant són: resistència a la <i>Phytophthora nicotinae</i>
Lanka Cherry	Srilanka	2010	<i>Lycopersicon esculentum M.</i>	Tomata	Irradiació de llavors amb rajos gamma (320 Gy). Atributs de la varietat mutant són: Forma semblant a la típica d'una pera.
Nishina Zao	Japó	2007	<i>Prunus cerasus L.</i>	Cirera	Irradiació de flors de la varietat Gyo-i-ko amb feixos iònics. Atributs de la varietat mutant són: Color de la flor groguenc.

## 7 Annexes

AL-BEELY	Sudàn	2007	<i>Musa sp.</i>	Banana	No especifica tractament .Atributs de la varietat mutant són: Rendiment un 30% major.
James Grieve Double Red	Rpública Txeca	1995	<i>Malus sp.</i>	Poma	Irradiació amb rajos gamma (62 Gy). Atributs de la varietat mutant són: gust bo i balancejat, rati àcid-sucre alterat, alt rendiment.
ALDAMLA	Turquía		<i>Prunus avium L.</i>	Cirera	Irradiació amb rajos (25 Gy). Atributs de la varietat mutant són: hàbit de creixement compacte (70-80%), millora qualitat fruita i pecíol llarg.
BURAK	Turquía		<i>Prunus avium L.</i>	Cirera dolça	Irradiació per rajos gamma (50 Gy).Atributs de la varietat mutant són: millora de rendiment productiu i calibre major.
CLEMENVERD	Espanya		<i>Citrus clementina</i>	Clementina	Irradiació no especificada. El principal atribut d'aquesta varietat mutant és que canvia de color un més després que la Clementina de Nules i amb procés de maduració pràcticament idèntic.
NERO	Espanya		<i>Citrus clementina</i>	Clementina	No especificat
NEUFINA	Espanya		<i>Citrus clementina</i>	Clementina	No especificat
NIAB Kinnow	Pakistan		<i>Citrus reticulata Blanco</i>	Mandarina	Irradiada amb rajos gamma (20Gy). Atributs no especificats
IAC 2014	Brazil		<i>Citrus sinensis L. Osbeck</i>	Taronja dolça	Irradiació amb rajos gamma (40Gy) de la varietat 'Pera'. Selecció de mutants.
PAU Kinnow-1	Índia		<i>Citrus reticulata Blanco</i>	Mandarina	Irradiada no especificat. Varietat Kinnow amb menor quantitat de llavors. <sup>3</sup>

<sup>3</sup> <https://mvd.iaea.org>



## 7.2 VARIETATS DE FRUITA OBTINGUDES AMB CRISPR

Fruit	Tecnologia	Diana	Nous atributs	Ref.
<b>Millora Qualitat</b>				
Tomata	CRISPR Cas9	CLV3	Major calibre	85
Tomata	CRISPR Cas9	PSY1	Color groc	88
Tomata	CRISPR Cas9	MYB12	Color rosat	89
Tomata	CRISPR Cas9	ANT2	Color púrpura	90
Tomata	CRISPR Cas9	RIN	Major vida útil	91
Tomata	CRISPR Cas9	ALC	Major vida útil	92
<b>Domesticació</b>				
Tomata	CRISPR Cas9	AGL6	Partenocàrpia	94
Tomata	CRISPR Cas9	IAA9	Partenocàrpia	95
Tomata	CRISPR Cas9	ARF7	Partenocàrpia	96
Tomata	CRISPR Cas9	<i>Edició múltiple</i>	Major concentració Licopè, nombre de fruits i calibre	97
Tomata	CRISPR Cas9	SP5G	Formació flor i fruit ràpida	99
<b>Estrès Biòtic</b>				
Tomata	CRISPR Cas9	<i>Seqüències víriques</i>	Resistència a <i>N. Bentamiana</i>	102
Tomata	CRISPR Cas9	DMR6	Resistència Mildiu i millora davant <i>P. syringae</i> , <i>Ph. Capisca</i> i <i>X. spp.</i>	104
Tomata	CRISPR Cas9	Mlo1	Resistència <i>O. neolycopersici</i> "transgene-free"	105
Tomata	CRISPR Cas9	PMR4	Resistència <i>O. neolycopersici</i>	106
Tomata	CRISPR Cas9	MAPK3	<i>B. cinerea</i>	107
Taronja	CRISPR Cas9	CsLOB1	Resistència <i>X. citri</i>	113
Aranja	<i>LbCas12a/Cpf1</i>	CsPDS	Resistència <i>X. citri</i>	115
Poma	CRISPR Cas9	DIPM-1 DIPM-2	Resistència <i>E. amylovora</i>	124
Raïm	CRISPR Cas9	VvWRKY52	Majora resistència a <i>B. cinerea</i>	135
Síndria	CRISPR Cas9	Clpskl	Major resistència <i>F. oxysporum niveum</i>	140
<b>Estrès Abiòtic</b>				
Tomata	CRISPR Cas9	CBF1	Major termotolerància	109
Tomata	CRISPR Cas9	BZR1	Major termotolerància	110
Tomata	CRISPR Cas9	MAPK3	Protecció sota estrès hídric	111
Síndria	CRISPR dCas9	ALS	Resistència a herbicides	137,138

Taula 6. Recopilació aplicacions tecnologies CRISPR Cas en fruita.

## 8. BIBLIOGRAFIA

1. Sharma S, Kaur R, Singh A. Recent advances in CRISPR/Cas mediated genome editing for crop improvement. *Plant Biotechnol Rep.* 2017;11(4):193–207.
2. Ashraf M. Inducing drought tolerance in plants: Recent advances. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2010;28(1):169–83.
3. Arora L, Narula A. Gene editing and crop improvement using CRISPR-cas9 system. *Front Plant Sci.* 2017;8(November).
4. Newell-McGloughlin M. Nutritionally improved agricultural crops. *Plant Physiol.* 2008;147(3):939–53.
5. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* (80- ). 2014;346(6213).
6. Gilbert LA, Horlbeck MA, Adamson B, Villalta JE, Chen Y, Whitehead EH, et al. Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. *Cell* [Internet]. 2014;159(3):647–61.
7. Sprink T, Eriksson D, Schiemann J, Hartung F. Regulatory hurdles for genome editing: process- vs. product-based approaches in different regulatory contexts. *Plant Cell Rep.* 2016;35(7):1493–506.
8. Waltz E. Tiptoeing around transgenics. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2012;30(3):215–7.
9. Laaninen T. New plant-breeding techniques Applicability of GM rules. *Eur Parliam* [Internet]. 2016;(May):8.
10. Gepts P. ORIGINS OF PLANT AGRICULTURE AND MAJOR CROPS IN THE MEDITERRANEAN BASIN – II.
11. Darwin C. *The origin of species.* 1859.
12. Kovach M, McCouch S. Leveraging natural diversity: back through the bottleneck. *Curr Opin Plant Biol.* 2008;11(2):193–200.
13. Novak F.J. HB. Plant breeding : Induced mutation technology for crop improvement. *Iae Abulletin.* 1992;4:25–33.
14. Auerbach C. Chemical mutagenesis. *Inst Anim Genet.* 1949;(January):355–87.
15. H. J. M. Artificial transmutation of the gene. *Science* (80- ). 1927;66:83–7.
16. Stadler LJ. Genetic Effects of X-Rays in Maize. *Proc Natl Acad Sci.* 1928;14(1):69–75.
17. Stadler LJ. Mutations in barley induced by x-rays and radium. *Science* (80- ). 1928;LXVIII(1756):186–7.
18. Sikora P, Chawade A, Larsson M, Olsson J, Olsson O. Mutagenesis as a tool in plant genetics, functional genomics, and breeding. *Int J Plant Genomics.* 2011;2011.
19. Wu JL, Wu C, Lei C, Baraoidan M, Bordeos A, Madamba MRS, et al. Chemical- and irradiation-induced mutants of indica rice IR64 for forward and reverse genetics. *Plant Mol Biol.* 2005;59(1):85–97.
20. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakamura A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isoenzyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol.* 1987;169(12):5429–33.
21. Barrangou R, Horvath P. A decade of discovery: CRISPR functions and applications. *Nat Microbiol*

- [Internet]. 2017;2(June):1–9.
22. Mojica FJM, Ferrer C, Juez G, Rodríguez-Valera F. Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning. *Mol Microbiol.* 1995;17(1):85–93.
  23. Groenen PMA, Bunschoten AE, Soolingen D van, Errtbden JDA va. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Mol Microbiol.* 1993;10(5):1057–65.
  24. Hoe N, Nakashima K, Grigsby D, Pan X, Dou SJ, Naidich S, et al. Rapid molecular genetic subtyping of serotype M1 group A *Streptococcus* strains. *Emerg Infect Dis.* 1999;5(2):254–63.
  25. Mojica FJM, Rodríguez-Valera F. The discovery of CRISPR in archaea and bacteria. *FEBS J.* 2016;283:3162–9.
  26. Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Dusko Ehrlich S. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology.* 2005;151(8):2551–61.
  27. Makarova KS, Grishin N V., Shabalina SA, Wolf YI, Koonin E V. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: Computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct.* 2006;1:1–26.
  28. Boyaval P, Moineau S, Romero D a, Horvath P. Against Viruses in Prokaryotes. *Science (80- ).* 2007;315(March):1709–12.
  29. Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR Interference Limits Horizontal Targeting DNA. *Science (80- ).* 2008;322(5909):1843–5.
  30. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology.* 2009;155(3):733–40.
  31. Garneau JE, Dupuis MÈ, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, et al. The CRISPR/cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature.* 2010;468(7320):67–71.
  32. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (80- ).* 2012;337(6096):816–21.
  33. Hilton IB, Vockley CM, Pratiksha I, Crawford GE, Reddy TE, Gersbach CA, et al. Activates Genes From Promoters and Enhancers. *Nat Biotechnol.* 2015;33(5):510–7.
  34. Tieman D, Zhu G, Resende MFR, Lin T, Nguyen C, Bies D, et al. A chemical genetic roadmap to improved tomato flavor. *Science.* 2017;355(6323):391–4.
  35. Shi J, Gao H, Wang H, Lafitte HR, Archibald RL, Yang M, et al. ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnol J.* 2017;15(2):207–16.
  36. Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C, et al. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol.* 2014;32(9):947–51.
  37. Waltz E. With a free pass, CRISPR-edited plants reach market in record time. *Nat Biotechnol.* 2018;36(1):6–7.
  38. Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, Nelson KE. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol.* 2005;1(6):0474–83.
  39. Makarova KS, Wolf YI, Iranzo J, Shmakov SA, Alkhnbashi OS, Brouns SJJ, et al. Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nat Rev Microbiol.*

- 2020;18(2):67–83.
40. Shmakov S, Abudayyeh OO, Makarova KS, Wolf YI, Gootenberg JS, Semenova E, et al. Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems. *Mol Cell* [Internet]. 2015;60(3):385–97.
  41. Amitai G, Sorek R. CRISPR-Cas adaptation: Insights into the mechanism of action. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2016;14(2):67–76.
  42. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(39):2579–86.
  43. Jiang F, Doudna JA. CRISPR – Cas9 Structures and Mechanisms. 2017;505–31.
  44. Jinek M, Jiang F, Taylor DW, Sternberg SH, Kaya E, Ma E, et al. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science* (80- ). 2014;343(6176):1–28.
  45. Heler R, Samai P, Modell JW, Weiner C, Gregory W, Bikard D, et al. Crystal struct. 2015;519(7542):199–202.
  46. Hiroshi Nishimasu, F. Ann Ran, Patrick D. Hsu, Silvana Konermann, Soraya Shehata, Naoshi Dohmae, Ryuichiro Ishitani, Feng Zhang ON. Crystal structure of cas9 in complex with guide rna and target DNA. *Cell*. 2014;156(5):935–49.
  47. Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife*. 2013;2013(2):1–9.
  48. Fonfara I, Le Rhun A, Chylinski K, Makarova KS, Lécivain AL, Bzdrenga J, et al. Phylogeny of Cas9 determines functional exchangeability of dual-RNA and Cas9 among orthologous type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(4):2577–90.
  49. Malzahn A, Lowder L, Qi Y. Plant genome editing with TALEN and CRISPR. *Cell Biosci*. 2017;7(1):1–18.
  50. Steinert J, Schiml S, Puchta H. Homology-based double-strand break-induced genome engineering in plants. *Plant Cell Rep*. 2016;35(7):1429–38.
  51. Cubbon A, Ivancic-Bace I, Bolt EL. CRISPR-Cas immunity, DNA repair and genome stability. *Biosci Rep*. 2018;38(5):1–10.
  52. Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2014;32(4):347–50.
  53. Piatek A, Ali Z, Baazim H, Li L, Abulfaraj A, Al-Shareef S, et al. RNA-guided transcriptional regulation in planta via synthetic dCas9-based transcription factors. *Plant Biotechnol J*. 2015;13(4):578–89.
  54. Alvarez-Venegas R, De-la-Peña C, Casas-Mollano JA. Epigenetics in plants of agronomic importance: Fundamentals and applications: Transcriptional regulation and chromatin remodelling in plants: Second edition. *Epigenetics Plants Agron Importance Fundam Appl Transcr Regul Chromatin Remodel Plants Second Ed*. 2019;1–415.
  55. Fonfara I, Richter H, Bratovič M, Le Rhun A, Charpentier E. The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA. *Nature*. 2016;532(7600):517–21.
  56. Zhang X, Wang J, Wang J, Cheng Q, Zheng X, Zhao G. Multiplex gene regulation by CRISPR-ddCpf1. *Cell Discov*. 2017;3:1–9.
  57. Tang X, Lowder LG, Zhang T, Malzahn AA, Zheng X, Voytas DF, et al. A CRISPR-Cpf1 system for efficient genome editing and transcriptional repression in plants. *Nat Plants*. 2017;3(February):1–5.

58. Alok A, Sandhya D, Jogam P, Rodrigues V, Bhati KK, Sharma H, et al. The Rise of the CRISPR/Cpf1 System for Efficient Genome Editing in Plants. *Front Plant Sci.* 2020;11(March):1–9.
59. Yamano T, Nishimasu H, Zetsche B, Hirano H, Slaymaker IM, Li Y, et al. Crystal Structure of Cpf1 in Complex with Guide RNA and Target DNA. *Cell* [Internet]. 2016;165(4):949–62.
60. Jiang W, Zhou H, Bi H, Fromm M, Yang B, Weeks DP. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(20):1–12.
61. Fan D, Liu T, Li C, Jiao B, Li S, Hou Y, et al. Efficient CRISPR/Cas9-mediated Targeted Mutagenesis in Populus in the First Generation. *Sci Rep* [Internet]. 2015;5:1–7.
62. Sandhya D, Jogam P, Allini VR, Abbagani S, Alok A. The present and potential future methods for delivering CRISPR/Cas9 components in plants. *J Genet Eng Biotechnol.* 2020;18(1).
63. Soda N, Verma L, Giri J. CRISPR-Cas9 based plant genome editing: Significance, opportunities and recent advances. *Plant Physiol Biochem* [Internet]. 2018;131:2–11.
64. Charrier A, Vergne E, Dousset N, Richer A, Petiteau A, Chevreau E. Efficient targeted mutagenesis in apple and first time edition of pear using the CRISPR-Cas9 system. *Front Plant Sci.* 2019;10(February):1–12.
65. Ma X, Zhang Q, Zhu Q, Liu W, Chen Y, Qiu R, et al. A Robust CRISPR/Cas9 System for Convenient, High-Efficiency Multiplex Genome Editing in Monocot and Dicot Plants. *Mol Plant* [Internet]. 2015;8(8):1274–84.
66. Khatodia S, Bhatotia K, Passricha N, Khurana SMP, Tuteja N. The CRISPR/Cas genome-editing tool: Application in improvement of crops. *Front Plant Sci.* 2016;7(APR2016):1–13.
67. Steinert J, Schiml S, Fauser F, Puchta H. Highly efficient heritable plant genome engineering using Cas9 orthologues from *Streptococcus thermophilus* and *Staphylococcus aureus*. *Plant J.* 2015;84(6):1295–305.
68. Kaya H, Mikami M, Endo A, Endo M, Toki S. Highly specific targeted mutagenesis in plants using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(February):1–9.
69. Hu X, Wang C, Fu Y, Liu Q, Jiao X, Wang K. Expanding the Range of CRISPR/Cas9 Genome Editing in Rice. *Mol Plant.* 2016;9(6):943–5.
70. Lee K, Zhang Y, Kleinstiver BP, Guo JA, Aryee MJ, Miller J, et al. Activities and specificities of CRISPR/Cas9 and Cas12a nucleases for targeted mutagenesis in maize. *Plant Biotechnol J.* 2019;17(2):362–72.
71. Kim H, Kim ST, Ryu J, Kang BC, Kim JS, Kim SG. CRISPR/Cpf1-mediated DNA-free plant genome editing. *Nat Commun* [Internet]. 2017;8:1–7.
72. Endo A, Masafumi M, Kaya H, Toki S. Efficient targeted mutagenesis of rice and tobacco genomes using Cpf1 from *Francisella novicida*. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(September):1–9.
73. Aman R, Ali Z, Butt H, Mahas A, Aljedaani F, Khan MZ, et al. RNA virus interference via CRISPR/Cas13a system in plants. *Genome Biol.* 2018;19(1):1–9.
74. Mikami M, Toki S, Endo M. Precision Targeted Mutagenesis via Cas9 Paired Nickases in Rice. *Plant Cell Physiol.* 2016;57(5):1058–68.
75. Zhang F, LeBlanc C, Irish VF, Jacob Y. Rapid and efficient CRISPR/Cas9 gene editing in Citrus using the YAO promoter. *Plant Cell Rep.* 2017;36(12):1883–7.
76. Yanfei Mao, Zhengjing Zhang, Zhengyan Feng, Pengliang Wei, Hui Zhang1 J, Ramón Botella and J-KZ. Development of germ-line-specific CRISPR-Cas9 systems to improve the production of heritable gene modifications in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol J.* 2016;14(2):519–32.

77. Wolter F, Klemm J, Puchta H. Efficient in planta gene targeting in *Arabidopsis* using egg cell-specific expression of the Cas9 nuclease of *Staphylococcus aureus*. *Plant J*. 2018;94(4):735–46.
78. Wang ZP, Xing HL, Dong L, Zhang HY, Han CY, Wang XC, et al. Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in *Arabidopsis* in a single generation. *Genome Biol* [Internet]. 2015;16(1):1–12.
79. Eid A, Ali Z, Mahfouz MM. High efficiency of targeted mutagenesis in *Arabidopsis* via meiotic promoter-driven expression of Cas9 endonuclease. *Plant Cell Rep*. 2016;35(7):1555–8.
80. Feng C, Su H, Bai H, Wang R, Liu Y, Guo X, et al. High-efficiency genome editing using a *dmc1* promoter-controlled CRISPR/Cas9 system in maize. *Plant Biotechnol J*. 2018;16(11):1848–57.
81. Tsutsui H, Higashiyama T. PKAMA-ITACHI vectors for highly efficient CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*. 2017;58(1):46–56.
82. Miller AJ, Gross BL. From forest to field: Perennial fruit crop domestication. *Am J Bot*. 2011;98(9):1389–414.
83. Brooks C, Nekrasov V, Lippman ZB, Van Eck J. Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system. *Plant Physiol*. 2014;166(3):1292–7.
84. Satpute MR, MJagdale S. Color, Size, Volume, Shape and Texture Feature Extraction Techniques for Fruits: A Review. *Int Res J Eng Technol*. 2016;(2010):2395–56.
85. Li H, Qi M, Sun M, Liu Y, Liu Y, Xu T, et al. Tomato transcription factor SLWUS plays an important role in tomato flower and locule development. *Front Plant Sci*. 2017;8(March):1–8.
86. Somssich M, Je B II, Simon R, Jackson D. CLAVATA-WUSCHEL signaling in the shoot meristem. *Dev*. 2016;143(18):3238–48.
87. Oltman AE, Jervis SM, Drake MA. Consumer attitudes and preferences for fresh market tomatoes. *J Food Sci*. 2014;79(10):S2091–7.
88. Hayut SF, Bessudo CM, Levy AA. Targeted recombination between homologous chromosomes for precise breeding in tomato. *Nat Commun* [Internet]. 2017;8(May):1–9.
89. Ballester AR, Molthoff J, de Vos R, Hekkert B te L, Orzaez D, Fernández-Moreno JP, et al. Biochemical and molecular analysis of pink tomatoes: Deregulated expression of the gene encoding transcription factor SLMYB12 leads to pink tomato fruit color. *Plant Physiol*. 2010;152(1):71–84.
90. Čermák T, Baltés NJ, Čegan R, Zhang Y, Voytas DF. High-frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome Biol*. 2015;16(1).
91. Ito Y, Nishizawa-Yokoi A, Endo M, Mikami M, Toki S. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the RIN locus that regulates tomato fruit ripening. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2015;467(1):76–82.
92. Lang Z, Wang Y, Tang K, Tang D, Datsenka T, Cheng J, et al. Critical roles of DNA demethylation in the activation of ripening-induced genes and inhibition of ripening-repressed genes in tomato fruit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(22):E4511–9.
93. Abbo S, Pinhasi van-Oss R, Gopher A, Saranga Y, Ofner I, Peleg Z. Plant domestication versus crop evolution: A conceptual framework for cereals and grain legumes. *Trends Plant Sci* [Internet]. 2014;19(6):351–60.
94. Klap C, Yeshayahou E, Bolger AM, Arazi T, Gupta SK, Shabtai S, et al. Tomato facultative parthenocarpy results from SIAGAMOUS-LIKE 6 loss of function. *Plant Biotechnol J*. 2017;15(5):634–47.
95. Serrani JC, Fos M, Atarés A, García-Martínez JL. Effect of gibberellin and auxin on parthenocarpic fruit

- growth induction in the cv Micro-Tom of tomato. *J Plant Growth Regul.* 2007;26(3):211–21.
96. Ueta R, Abe C, Watanabe T, Sugano SS, Ishihara R, Ezura H, et al. Rapid breeding of parthenocarpic tomato plants using CRISPR/Cas9. *Sci Rep [Internet].* 2017;7(1):1–8.
97. Zsögön A, Čermák T, Naves ER, Notini MM, Edel KH, Weigl S, et al. De novo domestication of wild tomato using genome editing. *Nat Biotechnol [Internet].* 2018;36(12):1211–6.
98. Li T, Yang X, Yu Y, Si X, Zhai X, Zhang H, et al. Domestication of wild tomato is accelerated by genome editing. *Nat Biotechnol.* 2018;36(12):1160–3.
99. Soyk S, Müller NA, Park SJ, Schmalenbach I, Jiang K, Hayama R, et al. Variation in the flowering gene SELF PRUNING 5G promotes day-neutrality and early yield in tomato. *Nat Genet.* 2017;49(1):162–8.
100. Langner T, Kamoun S, Belhaj K. CRISPR Crops: Plant genome editing toward disease resistance. *Annu Rev Phytopathol.* 2018;56(June):479–512.
101. Cao Y, Zhou H, Zhou X, Li F. Control of Plant Viruses by CRISPR/Cas System-Mediated Adaptive Immunity. *Front Microbiol.* 2020;11(October):1–9.
102. Tashkandi M, Ali Z, Aljedaani F, Shami A, Mahfouz MM. Engineering resistance against Tomato yellow leaf curl virus via the CRISPR/Cas9 system in tomato. *Plant Signal Behav [Internet].* 2018;13(10):1–7.
103. Borrelli VMG, Brambilla V, Rogowsky P, Marocco A, Lanubile A. The enhancement of plant disease resistance using crispr/cas9 technology. *Front Plant Sci.* 2018;9(August).
104. Paula de Toledo Thomazella D, Brail Q, Dahlbeck D, Staskawicz B. CRISPR-Cas9 mediated mutagenesis of a DMR6 ortholog in tomato confers broad-spectrum disease resistance. *bioRxiv.* 2016;064824.
105. Nekrasov V, Wang C, Win J, Lanz C, Weigel D, Kamoun S. Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. *Sci Rep [Internet].* 2017;7(1):1–6.
106. Koseoglou E. The study of SIPMR4 CRISPR/Cas9- mediated tomato allelic series for resistance against powdery mildew Eleni Koseoglou. 2017;1–29.
107. Zhang S, Wang L, Zhao R, Yu W, Li R, Li Y, et al. Knockout of SIMAPK3 Reduced Disease Resistance to Botrytis cinerea in Tomato Plants. *J Agric Food Chem.* 2018;66(34):8949–56.
108. Mushtaq M, Bhat JA, Mir ZA, Sakina A, Ali S, Singh AK, et al. CRISPR/Cas approach: A new way of looking at plant-abiotic interactions. *J Plant Physiol [Internet].* 2018;224–225:156–62.
109. Li R, Zhang L, Wang L, Chen L, Zhao R, Sheng J, et al. Reduction of Tomato-Plant Chilling Tolerance by CRISPR-Cas9-Mediated SICBF1 Mutagenesis. *J Agric Food Chem.* 2018;66(34):9042–51.
110. Yin Y, Qin K, Song X, Zhang Q, Zhou Y, Xia X, et al. BZR1 Transcription Factor Regulates Heat Stress Tolerance Through FERONIA Receptor-Like Kinase-Mediated Reactive Oxygen Species Signaling in Tomato. *Plant Cell Physiol.* 2018;59(11):2239–54.
111. Wang L, Chen L, Li R, Zhao R, Yang M, Sheng J, et al. Reduced drought tolerance by CRISPR/Cas9-mediated SIMAPK3 mutagenesis in tomato plants. *J Agric Food Chem.* 2017;65(39):8674–82.
112. Gmitter FG, Talon M. Citrus genomics. *Int J Plant Genomics.* 2008;2008.
113. Jia H, Wang N. Xcc-facilitated agroinfiltration of citrus leaves: a tool for rapid functional analysis of transgenes in citrus leaves. *Plant Cell Rep.* 2014;33(12):1993–2001.
114. Gottwald TR, Bassanezi RB, Paulo S. *Citrus Huanglongbing: The Pathogen and Its Impact Plant Health Progress Plant Health Progress.* 2007;1993(September):36.
115. Jia H, Zhang Y, Orbović V, Xu J, White FF, Jones JB, et al. Genome editing of the disease susceptibility

- gene CsLOB1 in citrus confers resistance to citrus canker. *Plant Biotechnol J*. 2017;15(7):817–23.
116. Jia H, Orbović V, Wang N. CRISPR-LbCas12a-mediated modification of citrus. *Plant Biotechnol J*. 2019;17(10):1928–37.
117. Perrier X, De Langhe E, Donohue M, Lentfer C, Vrydaghs L, Bakry F, et al. Multidisciplinary perspectives on (*Musa spp.*) domestication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(28):11311–8.
118. Dash PK, Rai R. Translating the “banana genome” to delineate stress resistance, dwarfing, parthenocarp and mechanisms of fruit ripening. *Front Plant Sci*. 2016;7(OCTOBER2016):1–7.
119. Kaur N, Alok A, Shivani, Kaur N, Pandey P, Awasthi P, et al. CRISPR/Cas9-mediated efficient editing in phytoene desaturase (PDS) demonstrates precise manipulation in *banana cv. Rasthali* genome. *Funct Integr Genomics*. 2018;18(1):89–99.
120. Naim F, Dugdale B, Kleidon J, Brinin A, Shand K, Waterhouse P, et al. Gene editing the phytoene desaturase alleles of Cavendish banana using CRISPR/Cas9. *Transgenic Res [Internet]*. 2018;27(5):451–60.
121. Maymon M, Sela N, Shpatz U, Galpaz N, Freeman S. The origin and current situation of *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* tropical race 4 in Israel and the Middle East. *Sci Rep [Internet]*. 2020;10(1):1–11.
122. Gottgens C. CRISPR could save bananas from fungus. *Springer Nature*. 2021;9:574-15.
123. Nishitani C, Hirai N, Komori S, Wada M, Okada K, Osakabe K, et al. Efficient Genome Editing in Apple Using a CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*. 2016;6(July):1–8.
124. ZHAO Y qiang, TIAN Y li, WANG L min, GENG G min, ZHAO W jun, HU B shi, et al. Fire blight disease, a fast-approaching threat to apple and pear production in China. *J Integr Agric [Internet]*. 2019;18(4):815–20.
125. Malnoy M, Viola R, Jung MH, Koo OJ, Kim S, Kim JS, et al. DNA-free genetically edited grapevine and apple protoplast using CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins. *Front Plant Sci*. 2016;7(DECEMBER2016):1–9.
126. Zaidi SS e. A, Mukhtar MS, Mansoor S. Genome Editing: Targeting Susceptibility Genes for Plant Disease Resistance. *Trends Biotechnol [Internet]*. 2018;36(9):898–906.
127. Pompili V, Dalla Costa L, Piazza S, Pindo M, Malnoy M. Reduced fire blight susceptibility in apple cultivars using a high-efficiency CRISPR/Cas9-FLP/FRT-based gene editing system. *Plant Biotechnol J*. 2020;18(3):845–58.
128. Jiao J, Kong K, Han J, Song S, Bai T, Song C, et al. Field detection of multiple RNA viruses/viroids in apple using a CRISPR/Cas12a-based visual assay. *Plant Biotechnol J*. 2020;1–12.
129. Liang Z, Duan S, Sheng J, Zhu S, Ni X, Shao J, et al. Whole-genome resequencing of 472 *Vitis* accessions for grapevine diversity and demographic history analyses. *Nat Commun [Internet]*. 2019;10(1):1–12.
130. Wang Y, Liu X, Ren C, Zhong GY, Yang L, Li S, et al. Identification of genomic sites for CRISPR/Cas9-based genome editing in the *Vitis vinifera* genome. *BMC Plant Biol [Internet]*. 2016;16(1):3–9.
131. Ren C, Liu X, Zhang Z, Wang Y, Duan W, Li S, et al. CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in Chardonnay (*Vitis vinifera L.*). *Sci Rep [Internet]*. 2016;6:1–9.
132. Nakajima I, Ban Y, Azuma A, Onoue N, Moriguchi T, Yamamoto T, et al. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in grape. *PLoS One*. 2017;12(5):1–16.
133. Wang X, Tu M, Wang D, Liu J, Li Y, Li Z, et al. CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in grape in the first generation. *Plant Biotechnol J*. 2018;16(4):844–55.



134. Evans K, Emmett R. Botrytis: questions & answers. *Wine Aust Aust wine* [Internet]. 2013;(July):1–7.
135. Tian S, Jiang L, Gao Q, Zhang J, Zong M, Zhang H, et al. Efficient CRISPR/Cas9-based gene knockout in watermelon. *Plant Cell Rep*. 2017;36(3):399–406.
136. Tian S, Jiang L, Cui X, Zhang J, Guo S, Li M, et al. Engineering herbicide-resistant watermelon variety through CRISPR/Cas9-mediated base-editing. *Plant Cell Rep* [Internet]. 2018;37(9):1353–6.
137. Yu Q, Powles SB. Resistance to AHAS inhibitor herbicides: Current understanding. *Pest Manag Sci*. 2014;70(9):1340–50.
138. Sauter M. Phytosulfokine peptide signalling. *J Exp Bot*. 2015;66(17):5161–9.
139. Zhang M, Liu Q, Yang X, Xu J, Liu G, Yao X, et al. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of *Clpsk1* in watermelon to confer resistance to *Fusarium oxysporum f.sp. niveum*. *Plant Cell Rep* [Internet]. 2020;39(5):589–95.
140. Callaghan SE, Puno VI, Williams AP, Weir BS, Balmas V, Sengsoulichan K, et al. First report of *Fusarium oxysporum f.sp. niveum* in the Lao PDR. *Australas Plant Dis Notes* [Internet]. 2016;11(1).
141. Shulaev V, Sargent DJ, Crowhurst RN, Mockler TC, Delcher AL, Jaiswal P, et al. The genome of woodland strawberry. *Nat Genet*. 2011;43(2):109–16.
142. Zhou J, Wang G, Liu Z. Efficient genome editing of wild strawberry genes, vector development and validation. *Plant Biotechnol J*. 2018;16(11):1868–77.
143. Martín-Pizarro C, Triviño JC, Posé D. Functional analysis of the TM6 MADS-box gene in the octoploid strawberry by CRISPR/Cas9-directed mutagenesis. *J Exp Bot*. 2019;70(3):949–61.