

Hintergrundpapier: CRISPR/Cas – Beschreibung der Möglichkeiten

Das Forschungsfeld um CRISPR/Cas entwickelt sich rasant weiter. Seit der Entwicklung der CRISPR/Cas-Technik im Jahr 2012 bis heute ist die Zahl der Veröffentlichungen zu dem Thema stark angestiegen. Dabei wird die Genschere vor allem in der Grundlagenforschung eingesetzt, um komplexe Wechselwirkungen in Organismen besser zu verstehen. Außerdem wird die Genschere selber ständig weiterentwickelt, um sie in so vielen Organismen wie möglich und für ganz unterschiedliche Anwendungen einzusetzen.

Dieser Hintergrund erklärt zum einen, wie mit scheinbar kleinen Veränderungen der DNA (SDN-1-Anwendungen) komplexe Anwendungen mit der Genschere in Pflanzen bewirkt werden. Zum anderen werden Weiterentwicklungen von CRISPR/Cas-Systemen vorgestellt, mit denen das Erbgut in Pflanzen möglichst uneingeschränkt verändert werden kann, sowie neue Verfahren mit denen die Genschere in pflanzliche Zellen eingeschleust werden können. Abschließend wird ein Überblick darüber gegeben, wie und für was CRISPR/Cas im Moment am häufigsten in Pflanzen verwendet wird.

Mit SDN-1-Anwendungen sind komplexe Veränderungen im Erbgut möglich

Veränderung mehrerer Genkopien (identischer DNA-Sequenzen)

Mit CRISPR/Cas ist es möglich, alle DNA-Bereiche zu verändern, die sich in ihrer Sequenz sehr ähnlich sind. Die Erkennungskomponente der Genschere (die guide RNA oder gRNA) wird dabei so entwickelt, dass die Genschere mehrere Genbereiche mit der gleichen DNA-Sequenz erkennt und schneidet. Speziell Pflanzen haben oft ein redundantes Genom, das heißt, Gene liegen oft mehrfach (als Genkopien oder Gene einer Genfamilie) oder als Varianten (sogenannte Allele) vor. Ist ein Gen in mehrfacher Ausführung vorhanden, können alle beziehungsweise mehrere Gene von der Genschere CRISPR/Cas erkannt und verändert werden.

Viele Pflanzen sind polyploid, das heißt, sie besitzen mehrere Chromosomensätze, wie zum Beispiel der Weizen mit einem sechsfachen Chromosomensatz, man sagt auch, er ist hexaploid. Gene liegen im Weizen also in sechsfacher Kopie vor. Wird nun gemeinsam mit der Genschere eine gRNA, die der Genschere dazu dient, die Zielsequenz im Erbgut aufzuspüren, in die pflanzliche Zelle eingebracht, kann die Zielsequenz der DNA mehrfach erkannt und geschnitten werden. Im Endeffekt können bis zu sechs Veränderungen auf einmal gemacht werden [1]. Mit Hilfe einer einzigen gRNA können so mehrere gleiche Allele in polyploiden Pflanzen gleichzeitig verändert werden [2; 3].

Außerdem können mit der Genschere mehrere Kopien eines Gens auf einmal verändert werden. Damit können ganze Genfamilien verändert oder sogar ausgeschaltet werden [4; 5]. Sie entstehen dadurch, dass sich Gene mehrfach duplizieren. Genfamilien können mehrere

hundert Gene umfassen. Die Gene einer Genfamilie können entweder in sogenannten Genclustern zusammenbleiben oder über das gesamte Erbgut verteilt sein (auf dem ursprünglichen Chromosom, aber auch auf verschiedenen Chromosomen). Die Gene in diesen Genfamilien können in ihrer DNA-Sequenz komplett identisch sein oder sich in einzelnen Basen unterscheiden, was auf Mutationsereignisse zurückgeführt werden kann. Genfamilien kommen in Pflanzen häufig vor und spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung neuer Pflanzenarten.

Multiplexing (Veränderung mehrerer unterschiedlicher DNA-Sequenzen)

Beim Multiplexing werden mehrere gRNAs zusammen mit der Genschere in die pflanzlichen Zellen eingebracht, um unterschiedliche DNA-Bereiche gleichzeitig zu verändern [6; 7]. Beim Multiplexing werden nicht nur einzelne Kopien der unterschiedlichen Zielgene verändert, sondern auch alle identischen Kopien der jeweiligen DNA-Sequenz.

Das Multiplexing wird von WissenschaftlerInnen als besonders wichtig angesehen, da viele Eigenschaften bei Pflanzen von mehr als einem Gen bestimmt werden, wie zum Beispiel die Reaktionen auf bestimmte Stressbedingungen. In einer Studie wurde die Genschere an drei unterschiedliche Zielbereiche im Weizen gesteuert und hat bis zu 18 DNA-Sequenzen auf einmal verändert [8]. Bei einem Reis wurden acht verschiedene Gene so bearbeitet, dass er nicht nur einen höheren Ertrag erhielt, sondern es auch zu Änderungen bei Wuchs und Duft kam [9]. Durch den Einsatz der CRISPR/Cas-Variante CRISPR/Cpf1 (auch MbCas12a genannt) aus dem Bakterium *M. bovoculi* ist es gelungen, im Reis bis zu 16 verschiedene Gene gleichzeitig zu verändern [10]. Diese regulieren verschiedene agronomisch relevante Eigenschaften sowie bakterielle Resistenzen.

Durch Multiplexing können auch Bereiche des Erbguts gelöscht werden. Dafür werden zwei verschiedene Zielsequenzen durch die Genschere angesteuert und geschnitten. Es kann dann dazu kommen, dass der "herausgeschnittene" Teil zwischen den Zielbereichen gelöscht wird. Das wird zum Beispiel dafür verwendet, um mehrere Zielgene, die in einem DNA-Bereich nebeneinander liegen, gemeinsam zu löschen [11-13].

Die Komplexität von möglichen Anwendungen der Genschere wie beispielsweise Multiplexing erhöht jedoch auch die Wahrscheinlichkeit für ungewollte Veränderungen von Stoffwechselwegen, wenn beispielsweise ein Gen ausgeschaltet wird, das an mehreren Prozessen in der Zelle beteiligt ist und dessen Funktionen noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Damit können biochemische Prozesse in den Pflanzen beeinflusst werden, die nicht beabsichtigt waren und die auch erst viel später in Erscheinung treten (z.B. unter bestimmten Stressbedingungen). Außerdem steigt mit der Komplexität der Eingriffe auch das Risiko unbeabsichtigter Veränderungen im Erbgut, also eher technischer Fehler, die während des Verfahrens auftreten können. Beides, die ungewollten Auswirkungen auf andere Stoffwechselwege und unbeabsichtigte Veränderungen der DNA werden im Hintergrund über die Risiken näher erklärt.

Veränderung von Bereichen des Erbguts, die für PflanzenzüchterInnen weniger zugänglich sind

Es gibt Bereiche im Erbgut von Pflanzen, die für die klassische Züchtung schwer zugänglich sind. Das sind beispielsweise DNA-Regionen, in denen natürlicherweise nur selten homologe Rekombinationen während der Reifeteilung (Bildung der Keimzellen, auch Meiose genannt) stattfinden. Während der Reifeteilung wird die Chromosomenzahl halbiert und so die Eizelle und der Pollen gebildet. Als homologe Rekombination wird ein Prozess während der Meiose bezeichnet, bei dem es zwischen homologen Chromosomen zu einem Stückaustausch kommen kann (Crossing Over). Durch den Austausch von bestimmten DNA-Regionen kann sich die genetische Vielfalt erhöhen. Es gibt an ganz bestimmten Stellen des Erbguts von Pflanzen Bereiche, an denen häufiger homologe Rekombination stattfindet (sogenannte rekombinatorische Hot Spots) als an anderen (sogenannte rekombinatorische Cold Spots). ZüchterInnen müssen oft mit gekoppelten Genen arbeiten, die nicht voneinander getrennt werden können, da sie sich in solchen rekombinatorischen Cold Spots befinden.

Gene, die sehr nah beieinander auf einem Chromosom liegen, werden auch als gekoppelt bezeichnet, weil sie sehr wahrscheinlich gemeinsam vererbt werden. Befinden sich zwei Gene auf verschiedenen Chromosomen oder auch auf demselben Chromosom, aber mit größerem Abstand, dann sind sie nicht gekoppelt und können getrennt voneinander vererbt werden (durch homologe Rekombination). In einigen Pflanzenarten sind viele DNA-Regionen gekoppelt, wie beispielsweise in der Tomate, bei der über 25% des Erbguts einer Kopplung unterliegt [14].

ZüchterInnen wollen gegebenenfalls gekoppelte Gene voneinander trennen, wenn beispielsweise eines der beiden Gene unerwünschte Eigenschaften in den Pflanzen vermittelt. Die Genschere ermöglicht es, einzelne Gene oder Gen-Varianten gezielt zu verändern, die durch die homologe Rekombination nicht erreichbar und an andere Gene gekoppelt sind. Es kann zum Beispiel eines der beiden Gene mit kleinen Veränderungen der DNA-Sequenz ausgeschaltet und damit die gemeinsame Vererbung bestimmter Eigenschaften aufgehoben werden. In einer Studie an Tomaten wurden mit der Genschere zwei Gene voneinander getrennt, die zum einen die Form der Frucht und zum anderen die Verbindung zwischen der Frucht und dem Stängel festlegen [15]. Durch CRISPR/Cas wurde die gemeinsame Vererbung dieser beiden Eigenschaften aufgehoben, so dass man eine Tomate erhielt, die eine ganz bestimmte Fruchtform aufweist und leichter zu ernten ist.

Außerdem wurde CRISPR/Cas in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* bereits so angewandt, dass große Bereiche eines Chromosoms umgelagert werden konnten. Dadurch ist es möglich, DNA-Regionen aus rekombinatorischen Cold Spots in andere DNA-Regionen zu verlagern, in denen häufiger homologe Rekombinationen stattfinden [16].

Es können mit der Genschere auch Regionen verändert werden, die in unmittelbarer Nähe der Zentromere von Chromosomen liegen. Das Zentromer teilt ein Chromosom in zwei Teile und ist der Bereich, an dem die zwei Hälften eines Chromosoms während der Zellteilung auseinandergezogen werden. In diesen Bereichen ist die DNA dichter verpackt als in anderen

und es findet dort kaum Stückaustausch während der Reifeteilung statt. Der Anteil ist zum Teil recht hoch: Im Mais und in der Gerste befinden sich ungefähr 20% aller Gene in der Nähe des Zentromers [17; 18]. Die Genschere kann durch unterschiedliche technische Verfahren auch diese Bereiche verändern [19; 20; 16].

Eigenschaften, die durch derartige Veränderungen bewirkt werden, waren durch bisherige Züchtungsverfahren kaum umsetzbar, weswegen solche genomeditierten Pflanzen einer geeigneten Risikobewertung unterzogen werden müssen (mehr dazu im Hintergrundpapier über die Risiken von CRISPR/Cas).

Veränderung von besonders geschützten Bereichen des Erbguts

Laut der klassischen Evolutionsbiologie können natürlicherweise in allen Genen mit gleicher Häufigkeit neue Mutationen auftreten, unabhängig von der Genfunktion und der Konsequenzen für die Fitness des jeweiligen Organismus. In den letzten Jahren sind einige wissenschaftliche Arbeiten erschienen, die zeigen, dass neue Mutationen in bestimmten Bereichen des Erbguts natürlicherweise häufiger auftreten als in anderen. Das zeigen Arbeiten mit *Arabidopsis thaliana* [21; 22], einer Modellpflanze aus der Grundlagenforschung, aber auch mit menschlichen Zellen [23; 24] und Hefezellen [25].

Mutationen sind demnach im Erbgut nicht gleichmäßig verteilt. In vielen funktionell wichtigen Bereichen des Erbguts treten weniger Mutationen auf, beispielsweise in Genbereichen. Die Mutationsrate ist dabei abhängig von einem bestimmten Reparaturmechanismus, der sogenannten DNA-Mismatch-Reparatur (MMR), die dafür zuständig ist, neu auftretende Mutationen in solchen Bereichen zu reparieren. WissenschaftlerInnen haben die MMR gezielt in *A. thaliana* ausgeschaltet, so dass Schäden an der DNA nicht mehr repariert werden konnten [22]. Sie konnten in diesen Untersuchungen zeigen, dass sich Mutationen dann besonders stark in Genbereichen anhäufen.

Auch innerhalb der Genbereiche selber gibt es Unterschiede in der Verteilung von Mutationen: In den äußeren treten mehr Mutationen auf als in den inneren Bereichen, die häufig Gen-Funktionen vermitteln. Dieses Muster lässt sich sogar bei genetischen Varianten, sogenannten Polymorphismen, in wilden Populationen nachweisen [21].

Es zeigte sich außerdem, dass bestimmte epigenetische Marker besonders häufig an den Genbereichen vorkommen, die besonders durch die MMR-Reparatur geschützt sind. Dort treten weniger häufig Mutationen auf. Epigenetische Marker sind vererbare Faktoren, die nicht direkt in der Abfolge der DNA-Sequenz verankert sind und die die Genaktivität regulieren. Diese epigenetischen Marker dienen der DNA-Mismatch-Reparatur als Erkennungssignal und bewirken, dass der Reparaturmechanismus an diesen Bereichen besonders häufig aktiv wird. Es sollte besonders betont werden, dass zwar theoretisch überall im Erbgut neue Mutationen auftreten können. Faktisch aber treten in bestimmten Bereichen des Erbguts wesentlich seltener Mutationen als in anderen auf. Ein Grund sind die mehrfach nachgewiesenen Mechanismen, die Mutationen an bestimmten Bereichen des Erbguts häufiger reparieren.

Mit CRISPR/Cas können Veränderungen auch in solchen besonders geschützten Bereichen induziert werden. Das ergibt sich aus der Wirkweise der Genschere: Im Falle, dass ein durch CRISPR/Cas bewirkter DNA-Doppelstrangbruch so repariert wird, dass der Originalzustand wiederhergestellt wird [26], kann CRISPR/Cas die Zielsequenz erneut erkennen und dort schneiden. Schlussendlich erhöht die Genschere so die Wahrscheinlichkeit, mit der auch in diesen geschützten Bereichen des Erbguts Veränderungen auftreten können. Mit CRISPR/Cas können also auch Genbereiche verändert werden, in denen Mutationen natürlicherweise eher unwahrscheinlich auftreten.

Eine Möglichkeit, solche Bereiche zu identifizieren, ist die Erstellung sogenannter Pangenome, die die Gesamtheit aller Gene und Genvarianten in einer Art umfassen. Dazu wird das Erbgut vieler verschiedener Vertreter oder Linien einer Art sequenziert (das bedeutet ermittelt). Das Pangenom einer Pflanzenart kann als Referenzgenom für alle natürlicherweise auftretenden genetischen Varianten dienen und so die gesamte genetische Vielfalt innerhalb einer Art abbilden. Es wurden beispielsweise bereits die Pangenome vom Mais und der Gerste veröffentlicht, die einige Linien der jeweiligen Art umfassen [27; 28]. Als nächster Schritt sollen auch wilde Vertreter dieser Nutzpflanzen sequenziert werden, um den natürlichen Genpool weiter aufzuklären. Sollten bestimmte Genvarianten, die durch die neuen Gentechnikverfahren erzeugt wurden, auch natürlicherweise im Genpool auftreten oder wurden bestimmte Genvarianten bereits durch konventionelle Verfahren bewirkt, müssen in einer geeigneten Risikobewertung dennoch die unbeabsichtigten Veränderungen, die durch technische Fehler der Genschere und deren mehrstufigen Anwendungsprozess entstehen können, untersucht werden.

De-novo-Domestizierung

Das Pangenom kann, wie zum Beispiel bei der Tomate [29; 30], dazu verwendet werden zu untersuchen, wie ähnlich heutige Nutzpflanzenarten ihren wilden Vertretern sind. Es zeigte sich, dass im Laufe der Domestizierung viele positive Eigenschaften der wilden Vertreter, wie etwa Stresstoleranzen, vielen Nutzpflanzenarten verloren gegangen sind. Die Genschere CRISPR/Cas soll deshalb an wilden Arten angewandt werden, um eine beschleunigte Domestizierung (auch *De-novo-Domestizierung* genannt) durchzuführen. Damit soll ihr Erbgut so verändert bzw. angepasst werden, dass sie bestimmte genetische Varianten aus gezüchteten Pflanzenlinien tragen [31-34]. Dafür wurde bereits mehrfach die Genschere verwendet. Im Ergebnis besitzen solche genomeditierten Pflanzen Eigenschaften aus wilden Arten, die im Zuge der Pflanzenzüchtung „verloren“ gegangen sind, und kombinieren diese mit „domestizierten“ Merkmalen, die sich als wichtig für die Kultivierung herausgestellt haben.

So wurden beispielsweise in einer wilden Tomatenart durch CRISPR/Cas9 sechs verschiedene Gene verändert, die sich als wichtig für den Ertrag und den Nährstoffgehalt von domestizierten Tomaten erwiesen haben [31]. In einer weiteren Studie wurde in einer wilden Reis-Art, die einen vierfachen Chromosomensatz (tetraploid) besitzt, Eigenschaften der Domestizierung wie der Kornsize in der Ähre und die Länge der Grannen verändert [32; 33].

Der heutzutage vielfach angebaute Reis besitzt nur zwei Chromosomensätze, er ist also diploid. Ein erhöhter Chromosomensatz birgt den Vorteil, dass im Falle einer auftretenden (negativen) Mutation immer noch viele weitere Genkopien im Erbgut vorhanden sind. Außerdem können sich Pflanzen mit mehr als zwei Chromosomensätzen besser an sich verändernde Umweltbedingungen anpassen.

Wie bereits beschrieben, verwendeten die AutorInnen der Studie als Ausgangspflanze einen tetraploiden Verwandten der heutzutage angebauten Reissorten. Dieser „wilde“ Reis besitzt Eigenschaften wie eine hohe Biomasse (er wächst also viel höher), verschiedene Stresstoleranzen und Hitzetoleranz. Viele Gene, die an der Domestizierung vom Reis beteiligt sind, sind auch im Erbgut des wilden Verwandten vorhanden und wurden durch die WissenschaftlerInnen mit Hilfe der Genschere verändert. So wurden unter anderem die Länge der Grannen vermindert, der Kornausfall und die Höhe der Pflanzen insgesamt reduziert.

In den Studien, die die Genschere für eine *De-novo*-Domestizierung verwenden [31; 32; 34; 35], wurden komplexe Eingriffe in das Erbgut der Nutzpflanzen bewirkt, indem vor allem mehrere kleine SDN-1-Veränderungen kombiniert wurden. Es wurden beispielsweise durch Multiplexing verschiedene Gene gleichzeitig oder alle Genkopien auf einmal verändert. Die *De-novo*-Domestizierung ist ein eindrucksvolles Anwendungsbeispiel, das zeigt, wie mit kleinen Eingriffen tiefgreifende Veränderungen im Erbgut von Pflanzen bewirkt werden können. Solche Pflanzen müssen einer geeigneten Risikobewertung unterzogen werden, um zum einen unbeabsichtigte Nebenwirkungen zu untersuchen, die durch die Anwendung der Technik auftreten können, und zum anderen, um ungewollte Effekte auf andere Stoffwechselwege aufzuspüren. Mehr Informationen dazu sind im Hintergrundpapier über die Risiken von CRISPR/Cas zu finden.

Weiterentwicklung der Genschere

Im Folgenden wird vorgestellt, wie die Genschere CRISPR/Cas bereits weiterentwickelt wurde, um sie für so viele Anwendungen in Pflanzen wie möglich einzusetzen. Dabei wird zum einen die klassische Genschere CRISPR/Cas9 angepasst oder auch ganz neue Varianten der Genschere erzeugt.

Veränderungen der klassischen Genschere CRISPR/Cas9

Die klassische Genschere CRISPR/Cas9 kann in ihrer Struktur so verändert werden, dass sie noch an DNA binden, aber nicht mehr schneiden kann. Man nennt diese Form der Genschere dead Cas9 oder auch dCas9. An diese nicht mehr zum Schneiden fähige Genschere können verschiedene Enzyme molekularbiologisch angehängt werden. Die dCas9 wirkt dann als Plattform, die ein angehängtes Enzym an eine bestimmte Stelle im Erbgut „trägt“. An der Zielsequenz der DNA können diese Enzyme ganz unterschiedliche Reaktionen bewirken, die nachfolgend genauer beschrieben werden.

Base Editing

Beim Base Editing werden Enzyme an die dCas9 angehängt, die gezielt spezifische Basen an der Zielsequenz der DNA verändern können. Die Abfolge der Basen legt die Sequenz (den genetischen Code) der DNA fest. In der DNA werden die vier Basen Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C), Thymin (T) verwendet. Beim Base Editing kann eine Base gezielt in eine andere Base umgewandelt werden, ohne dass die Zielsequenz geschnitten und eine DNA-Vorlage verwendet wird [36; 37]. Beispielsweise kann Cytosin in Thymin und Adenin in Guanin umgewandelt werden. Base Editing wurde bereits mehrfach in Pflanzen verwendet [38-40], unter anderem wurden mehrere verschiedene Zielgene gleichzeitig verändert (Multiplexing) [41; 42]. Dabei wurden vor allem Eigenschaften wie Herbizidtoleranzen [42; 41; 43] bewirkt. Beim Base Editing können aber auch unbeabsichtigte Veränderungen in der Zelle auftreten, die im Hintergrundpapier über die Risiken von CRISPR/Cas näher beschrieben werden.

Prime Editing

Beim Prime Editing wird mit Hilfe einer veränderten CRISPR/Cas9-Genschere nur ein Einzelstrang der DNA der Zielsequenz durchtrennt [44]. Man nennt diese Art der Genschere auch Nickase. Die Erkennungskomponente der Genschere wurde beim Prime Editing so verändert, dass sie neben der Erkennung noch eine zweite Funktion hat: Sie dient gleichzeitig auch als Reparaturvorlage, um eine gezielte Veränderung an der Zielsequenz herbeizuführen. Die Erkennungskomponente beim Prime Editing wird auch als pegRNA (Abkürzung für Prime Editing gRNA) bezeichnet. Ein Enzym, die sogenannte Reverse Transkriptase, wird beim Prime Editing an die Genschere geknüpft. Dieses Enzym ist eine Art Übersetzer, der die pegRNA in DNA umwandelt. Dieses Stück DNA dient dann als DNA-Vorlage zur Reparatur des DNA-Einzelstrangbruchs und wird an dieser Stelle ins Erbgut kopiert. Die beiden DNA-Stränge an der Zielsequenz passen dann allerdings nicht mehr zueinander. Die Genschere schneidet jedoch auch den anderen, nicht veränderten DNA-Einzelstrang, und die bereits in den veränderten DNA-Einzelstrang kopierte DNA-Vorlage dient dann der Reparatur dieses Schnittes. Mit Prime Editing können viele verschiedene Veränderungen an der Zielsequenz herbeigeführt werden, wie Deletionen sowie Insertionen; oder einzelne Basen können in jede andere Basenart verändert werden.

Prime Editing wurde bereits mehrfach in Pflanzen verwendet [45-47], allerdings ist die Effizienz, damit Veränderungen an der Zielsequenz zu bewirken, noch recht gering [48; 49]. Diese hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie beispielsweise der verwendeten Reversen Transkriptase (dem Übersetzer der pegRNA) oder dem Design der pegRNA [50]. WissenschaftlerInnen arbeiten bereits daran, das Prime Editing in Pflanzen weiterzuentwickeln und die Effizienz zu verbessern [51]. Bisher gibt es nur wenige Studien, die systematisch die Risiken des Verfahrens untersuchen [52; 53]. Mehr Informationen darüber sind im Hintergrundpapier über die Risiken von CRISPR/Cas zu finden.

Epigenetische Veränderung durch CRISPR/Cas (Epigenome Editing)

Die Epigenetik umfasst Mechanismen und zum Teil vererbare Veränderungen am Erbgut, die nicht auf Veränderungen der DNA-Sequenz beruhen. Das kann sich auf den Phänotyp eines Organismus, also auf das äußere Erscheinungsbild, auswirken. Durch die Epigenetik wird u.a. die Aktivität von Genen reguliert, beispielsweise während der Entwicklung von Lebewesen oder auch in Reaktion auf die Umwelt. Dafür werden epigenetische Marker auf die DNA und/oder Proteine, die eng mit der DNA assoziiert sind (sogenannte Histone), übertragen. Man kann sich diese epigenetischen Marker wie kleine Schalter vorstellen, die an Genen sitzen und sie an- oder ausschalten. Bestimmte Enzyme hängen sie in unterschiedlichen Bereichen des Erbguts an die DNA oder die Proteine an. Sogenannte Methylgruppen können beispielsweise auf die DNA übertragen werden und sind typische epigenetische Marker der DNA. Auch an die Histone können verschiedene epigenetische Marker angeheftet werden, unter anderen Methyl- oder Phosphatgruppen.

Beim sogenannten Epigenome Editing wird die nicht schneidefähige Genschere dCas9 verwendet und entweder direkt oder indirekt an Enzyme gekoppelt, die die epigenetischen Marker an der Zielsequenz der DNA verändern [54-56]. WissenschaftlerInnen setzen das Epigenome Editing ein, um damit Gene gezielt an- oder abzuschalten. Im Moment wird es vor allem in der Grundlagenforschung bei Pflanzen eingesetzt und weiterentwickelt. Dabei werden sowohl die Methylierung der DNA [57] als auch die epigenetischen Marker von Histonen [58; 59] verändert. Von besonderer Bedeutung ist auch hier eine geeignete Untersuchung von ungewollten Nebeneffekten, da die an die dCas9 angehefteten Enzyme auch anderen Bereichen des Erbguts epigenetische Marker anhängen können (mehr Informationen dazu im Hintergrund über die Risiken).

CRISPR-Interferenz (CRISPRi) und CRISPR-Aktivierung (CRISPRa)

Die Genschere CRISPR/dCas9 wird auch an bestimmte regulatorische DNA-Bereiche im Erbgut geführt, womit sie das Ablesen von Zielgenen behindern kann. Das führt dann dazu, dass das entsprechende Protein nicht mehr gebildet wird [60]. Die DNA-Sequenz wird bei dieser Anwendung von dCas9 nicht geschnitten und die „stumpfe“ Genschere verändert die Abfolge der DNA-Sequenz auch nicht. Solche Anwendungen werden auch als CRISPR-Interferenz oder CRISPRi bezeichnet. Alternativ können an dCas9 bestimmte regulatorische Faktoren gekoppelt werden, die durch die räumliche Nähe zu Zielgenen die Genexpression aktivieren bzw. anschalten (CRISPR-Aktivierung/CRISPRa) [61; 58] oder inaktivieren (CRISPRi) [60; 62] können.

Neue Varianten der Genschere

Die am häufigsten verwendete Genschere ist CRISPR/Cas9, bei der die Schneidekomponente Cas9 aus dem Bakterium *Streptococcus pyogenes* stammt. Es werden aber auch andere CRISPR/Cas-Systeme verwendet, um die Anwendungsmöglichkeiten der Genschere zu erweitern, wie CRISPR/Cpf1 [63] oder CRISPR/Cas13 zur Veränderung von RNA [64].

Die Genschere-Varianten unterscheiden sich u.a. dadurch, dass sie eine ganz spezifische kurze DNA-Sequenz im Erbgut des Zielorganismus erkennen, die auch „PAM-Sequenz“ (PAM

steht für *protospacer adjacent motif*) genannt wird. Die PAM-Sequenz liegt vor der eigentlichen Zielsequenz und dient als Stoppssequenz für die Genschere. Der Enzymkomplex stoppt an der PAM-Sequenz und prüft mit der gRNA, ob die davor liegende DNA-Sequenz mit dieser zusammenpasst. Die gRNA erkennt zum einen den Zielbereich auf der DNA und bindet zum anderen die Schneidekomponente, das Cas-Protein, und bringt es in Position zum Schneiden. Wenn die Zielsequenz erkannt wurde, schneidet die Genschere an dieser Stelle den DNA-Doppelstrang und bricht ihn auseinander.

Die CRISPR/Cas-Varianten stammen aus unterschiedlichen Bakterienarten und haben ihre eigenen ganz charakteristischen PAM-Sequenzen, mit der sie Zielbereiche aufspüren. Bei der klassischen Genschere ist es die DNA-Sequenz mit der Abfolge „NGG“, wobei das „N“ für eine beliebige Base der DNA steht und das „G“ für Guanin. Die CRISPR/Cas-Variante CRISPR/Cpf1 erkennt die Abfolge „TTTV“ als PAM-Erkennungssequenz im Erbgut des Zielorganismus, wobei das „T“ für Thymin und das „V“ für eine der drei Basen Guanin, Cytosin oder Adenin steht.

Die Genscheren-Variante CRISPR/Cpf1 steuert also eine andere PAM-Sequenz an und ermöglicht es WissenschaftlerInnen, andere Bereiche des Erbguts zu verändern, die beispielsweise mit der klassischen Genschere CRISPR/Cas9 nicht erreichbar sind. Außerdem ist CRISPR/Cpf1 effizienter als CRISPR/Cas9 und soll weniger unbeabsichtigte Off-Target-Effekte im Erbgut bewirken (siehe Hintergrundinformationen über die Risiken von CRISPR/Cas).

Es gibt sogar Forschungsansätze, die Genscheren-Varianten entwickeln wollen, die ohne eine spezifische PAM-Sequenz auskommen [65]. Solche Varianten sind jedoch sehr anfällig für Fehler und müssen für präzisere Anwendungen noch weiterentwickelt werden.

Neben der Erweiterung der Möglichkeiten (so viele Zielbereiche wie möglich mit den Genscheren-Varianten zu verändern) soll damit auch das Auftreten von unbeabsichtigten Veränderungen, wie zum Beispiel Off- und On-Target-Effekte, reduziert werden. So wurden beispielsweise natürlicherweise in verschiedenen Bakterienarten vorkommende CRISPR/Cas9-Genscheren (aus z.B. *Streptococcus pyogenes* und *Staphylococcus aureus*) und auch synthetisch, also im Labor erzeugte, CRISPR/Cas9-Varianten (z.B. SpCas9 HF1, HypaCas9 und HiFi Cas9) entwickelt und verwendet [66].

RNA Editing

Auch RNA kann mit Hilfe von CRISPR/Cas gezielt manipuliert werden. Die RNA hat zentrale Aufgaben in Zellen: RNA fungiert in den Zellen unter anderem als Zwischenprodukt bei der Übersetzung von Gen-Sequenzen in die entsprechenden Proteine. Die DNA-Sequenz wird als Vorlage verwendet, um RNA-Stücke zu bilden, die dann genutzt werden, um Proteine herzustellen. Proteine sind aus einer Kette von Aminosäuren (das sind die Bausteine der Proteine) aufgebaut. Jede Aminosäure wird von bestimmten Kombinationen aus drei Basen der DNA festgelegt. Das heißt, dass die Abfolge der DNA-Sequenz die genaue Reihenfolge der Aminosäuren in einem Protein festlegt.

WissenschaftlerInnen haben CRISPR/Cas-Varianten gefunden, die RNA-Moleküle schneiden können [64; 67; 68]. Die CRISPR/Cas-Variante Cas13 funktioniert ähnlich wie CRISPR/Cas9, nur dass CRISPR/Cas13 RNA statt DNA schneidet. Die Erkennungskomponente von CRISPR/Cas13 wird als crRNA (crRNA steht für CRISPR RNA) bezeichnet. CRISPR/Cas13 wird mit Hilfe der crRNA an die gewünschte RNA gesteuert und schneidet sie. Dadurch sind weniger RNA-Moleküle vorhanden und die dazugehörigen Proteine werden entsprechend weniger gebildet.

CRISPR/Cas13 wurde bereits in verschiedenen Anwendungen in Pflanzen eingesetzt [69; 70]. In Tabakpflanzen wurde die genetische Information zur Bildung der RNA-Schere CRISPR/Cas13a beispielsweise dauerhaft in das Erbgut der Pflanze eingebaut, um die Pflanzen vor einer Infektion mit dem Turnip Mosaic Virus (TuMV) zu schützen [69]. Das Erbgut des TuMV besteht aus RNA. CRISPR/Cas13a erkennt bei einer Infektion mit TuMV das eindringende virale Erbgut und zerschneidet es. Die gentechnisch veränderten Pflanzen sind also resistenter gegenüber dem TuMV.

Es wurden auch Versionen der CRISPR/Cas13-Genschere (dCas13, dead Cas13) entwickelt, die eine Ziel-RNA zwar noch binden, aber nicht mehr schneiden können. dCas13-Varianten können mit bestimmten Enzymen verknüpft werden, die manche Arten von RNA-Basen in andere verwandeln (z.B. Adenosin in Inosin) [68]. WissenschaftlerInnen können damit Veränderungen der RNA-Sequenz und des Aufbaus von Proteinen bewirken, ohne das Erbgut des Zielorganismus dauerhaft zu beeinflussen. Die durch CRISPR/Cas 13 veränderte RNA wird dann natürlicherweise in den Zellen abgebaut. Solche Veränderungen sind nicht auf der Ebene der DNA sichtbar. Bei einer Risikobewertung müssen demnach die Zusammensetzungen der RNAs, der Proteine und der Stoffwechselprodukte untersucht werden. Mehr dazu im Hintergrundpapier über die Risiken von CRISPR/Cas.

Neue Verfahren, um die Genschere in pflanzliche Zellen einzuschleusen

Bislang werden am häufigsten die Verfahren der alten Gentechnik eingesetzt, um die genetische Information zur Bildung der Genschere in pflanzliche Zellen einzubringen (weitere Informationen dazu finden Sie in den Hintergrundinformationen über die Technik von CRISPR/Cas). In den letzten Jahren wurden darüber hinaus noch verschiedene neue Verfahren entwickelt.

Es wurden beispielsweise RNA-Viren dazu verwendet, gRNAs in transgene Tabakpflanzen einzubringen [71]. Die Genschere-DNA ist zu groß, um mit Hilfe von RNA-Viren eingeführt zu werden. Deshalb tragen die Tabakpflanzen die genetische Information zur Bildung der Schneidekomponente der Genschere bereits in sich. Die gRNAs werden über das Tabak-Rattle-Virus in die transgenen Pflanzen eingeschleust und bewirken eine Veränderung des Zielgens [71]. Die Verwendung von RNA-Viren zum Einschleusen von Genschere steht noch ziemlich am Anfang, denn die WissenschaftlerInnen müssen mit transgenen Pflanzen arbeiten, die die DNA der Genschere bereits in sich tragen. Das eigentliche Ziel besteht darin, sowohl die Genschere als auch die Wegweiser mit Hilfe der RNA-Viren einzuschleusen und so den

Zwischenschritt über eine transgene Pflanze zu vermeiden. Eine Alternative zu den Methoden der alten Gentechnik bietet die hier beschriebene Methode nicht.

In einer anderen Studie wird ein Weizen mit Pollen von transgenen Maispflanzen bestäubt [72]. Es handelt sich also um eine artübergreifende Bestäubung. Das Erbgut des Mais enthält die genetische Information zur Bildung der Genschere und mehrere gRNAs. Nachdem der Weizen mit dem Maispollen bestäubt wurde, wird die Genschere in den Weizenembryonen gebildet und bewirkt die Veränderung an den Zielregionen der DNA des Weizens. Die Chromosomen des Mais werden allerdings nach einer gewissen Zeit abgebaut, da der Mais und der Weizen nicht kompatibel sind. Der einfache Chromosomensatz des Weizens wird mit Hilfe einer Substanz namens Colchizin verdoppelt, der genomeditierte Weizen ist nun in seiner genetischen Information reinerbig. Die resultierenden Embryos werden in der Zellkultur gehalten und Weizenpflanzen daraus regeneriert. Eine Stärke der hier beschriebenen Methode ist sicherlich, dass auf diese Weise reinerbige Weizenpflanzen mit der gewünschten genomeditierten Veränderung hergestellt werden können. Es zeigte sich jedoch, dass es auch zu mischerbigen Weizenpflanzen bezogen auf die Veränderungen an der Zielregion kommen kann. Hier spielen sowohl der Zeitpunkt der Bildung als auch die Menge der gebildeten Genschere eine entscheidende Rolle. Es besteht also noch Optimierungsbedarf, bei dem nicht vergessen werden darf, dass bei einer stärkeren Genexpression der Genschere auch vermehrt Off-Target-Effekte im Erbgut des Weizens herbeigeführt werden können. Weitere Informationen dazu sind im Hintergrundpapier über die Risiken von CRISPR/Cas zu finden.

In einem weiteren Artikel wird eine neue Methode vorgestellt, die eine Alternative zu der Arbeit mit Gewebe- und Zellkulturen darstellt [73]. Die Arbeit mit Zellkulturen stellt bei der Herstellung von transgenen und genomeditierten Pflanzen immer noch eine Schwachstelle dar: Bei nur wenigen Arten ist es möglich, aus Zellkulturen neue veränderte Pflanzen zu entwickeln. Außerdem handelt es sich um einen langwierigen Prozess, bei dem neue und ungewollte Mutationen im pflanzlichen Erbgut möglich sind. Am Spross und in der Wurzel befinden sich besondere Bereiche von Pflanzen, die sogenannten Meristeme. Hier teilen sich die Zellen und führen so zum Wachstum und zur Entwicklung der gesamten Pflanze. WissenschaftlerInnen haben nun über das *Agrobacterium tumefaciens* bestimmte Gene, die die Entwicklung solcher „Teilungszonen“ (sogenannte Meristeme) regulieren, in Setzlinge von Tabakpflanzen eingebracht. Das führte dazu, dass sich auf den Setzlingen neue Setzlinge ausbildeten. Dieses System wurde dann so erweitert, dass zusätzlich noch die Genschere CRISPR/Cas gemeinsam mit einer spezifischen gRNA mit in die Tabaksetzlinge eingebracht werden konnte. Mit CRISPR/Cas wurden dann zwei Gene ausgeschaltet, die wichtig für die Bildung von Carotinoiden sind. Dadurch konnten die genomeditierten Setzlinge anhand ihrer weißen Farbe identifiziert werden, weil ihnen der grüne Farbstoff Chlorophyll fehlte. Einige Setzlinge entwickelten zum Teil sogar Blüten und Samen, die es ermöglichten, die genomeditierten Veränderungen an die nächste Generation weiterzugeben. Erfolgreich angewandt wurde dieses Verfahren in Tabak, Kartoffeln, Tomaten und Trauben.

Ein anderes Verfahren, das den aufwendigen Arbeitsprozess in Zellkulturen und die Regeneration von Pflanzen umgeht, heißt *In-planta*-Partikelbeschuss und wurde bisher in

verschiedenen Weizenlinien beschrieben [74; 75]. Dabei werden kleine Goldpartikel, die mit der genetischen Information der Genschere und der gRNA beschichtet sind, direkt in Teilungszonen (Meristeme) der Weizen-Embryonen eingeschossen. In den nachfolgenden Generationen kann dann bestimmt werden, ob das entsprechende Zielgen durch die Genschere verändert wurde. Der Partikelbeschuss kann jedoch erwiesenermaßen zu Umstrukturierungen des Erbguts und der transgenen Genscheren-DNA in den beschossenen Pflanzen führen [76; 77] (mehr dazu im Hintergrundpapier über die Risiken von CRISPR/Cas).

Eine besondere Anwendungsmöglichkeit von CRISPR/Cas: Gentechnisch veränderte Pflanzenviren sollen die Genschere auf dem Feld verbreiten

Gentechnisch veränderte Pflanzenviren sollen durch bestimmte Insekten, wie Blattläuse oder Grashüpfer, auf Pflanzen übertragen werden und die infizierten Pflanzen dann so verändert werden, dass sie beispielsweise resistenter gegenüber Schädlingen oder Trockenheit sind. Damit sollen Nutzpflanzen auf dem Feld schnell auf sich verändernde Umweltbedingungen angepasst werden. Dafür werden die Insekten als Transportmittel für die gentechnisch veränderten Pflanzenviren verwendet. Die Insekten infizieren die Pflanzen mit den Pflanzenviren, die die genetische Information zur Bildung der Genschere CRISPR/Cas auf die Pflanzen übertragen. Die Genschere wird dann in den Pflanzen gebildet und soll die jeweiligen Zielgene erkennen und schneiden. Die gentechnische Veränderung findet also direkt auf dem Feld statt und entzieht sich der weiteren Kontrolle. Diese Technik wurde bereits von einigen WissenschaftlerInnen kritisiert, da nicht nur das Risiko vielfältiger Umweltauswirkungen, sondern auch des Missbrauchs als Biowaffen besteht [78; 79].

Was wird in Pflanzen am häufigsten gemacht?

Ein Blick in marktorientierte Pflanzen-Studien ist aufschlussreich und zeigt, woran und womit in den letzten Jahren gearbeitet wurde [43; 80]. Seit 2014 ist die Anzahl an Studien, die CRISPR/Cas in Pflanzen verwenden, stark angestiegen. Dabei wird vor allem die klassische Genschere CRISPR/Cas9 (174 Studien) eingesetzt, nur eine Studie verwendete CRISPR/Cpf1, zwei CRISPR/Cas13a und sieben Studien Base Editing [43]. Die anderen zielgerichteten Genscheren, wie TALENs und Zinkfinger-Nukleasen, werden auch nur zu einem geringen Anteil genutzt. Ungefähr 80% aller Studien wenden die Transformation mit dem *Agrobacterium tumefaciens* an, um die genetische Information der Genschere in pflanzliche Zellen einzuschleusen, rund 10% den Partikelbeschuss. Nur ein geringer Anteil schleust die Genschere als bereits gebildeten Enzymkomplex ein (ca. 1 %).

Es wurden in den Studien Eigenschaften in Pflanzen verändert, die den agronomischen Wert steigern, die Nahrungsmittelqualität verändern, Herbizidtoleranzen herbeiführen, abiotische und biotische Stresstoleranz bewirken und für industrielle Zwecke verbessern sollen. Von den insgesamt 231 marktorientierten Studien wird bislang eine genomeditierte Sojabohne der Firma Calyxt kommerziell angebaut, deren Öl in Amerika als Speiseöl verkauft wird. Die Sojabohne besitzt einen reduzierten Gehalt an gesättigten Fettsäuren und einen erhöhten Anteil Ölsäure. Sie wurde mit der zielgerichteten Genschere TALENs verändert. Die erste mit

CRISPR/Cas veränderte Pflanze, die 2021 in Japan zum Verzehr freigegeben wurde, ist eine Tomate der Firma Sanatech, deren Früchte mehr GABA, einen Neurotransmitter, besitzt und eine blutdrucksenkende Wirkung aufweisen soll. Mit chemischer Mutagenese konnten im Zielbereich der Zielgene bisher keine Mutationen eingeführt werden, mit CRISPR/Cas hingegen schon [81].

Ungefähr 100 Studien verwenden die Genschere in marktorientierten Anwendungen dazu, in diploiden Pflanzen einzelne Gene auszuschalten bzw. zu verändern [82; 83], auch die Tomate mit dem erhöhten GABA-Gehalt gehört dazu [81]. In ca. 50 Studien werden mehrere Gene, beispielsweise Gene einer Genfamilie [4; 84], Genkopien [85; 86] und/oder mehrere Allele in polyploiden Pflanzen [87; 88] verändert. In ungefähr 35 Studien wird Multiplexing dazu verwendet, gleich mehrere Gene auf einmal zu bearbeiten [9; 31]. 92% der Studien verwenden die Genschere für SDN-1-, 3% für SDN-2- und 5 % für SDN-3-Anwendungen.

Zusammenfassung

In diesem Hintergrundpapier wurden zum einen Möglichkeiten erklärt, wie SDN-1-Anwendungen der Genschere CRISPR/Cas dazu verwendet werden, um komplexe Veränderungen im Erbgut von Pflanzen zu bewirken. Zum anderen wurden Weiterentwicklungen der klassischen Genschere (Base Editing, Prime Editing etc.), ganz neue Genscheren-Varianten (CRISPR/Cas13, CRISPR/Cpf1) und einige neue Verfahren, um die Genscheren in pflanzliche Zellen einzuschleusen, vorgestellt.

Eine Analyse von marktorientierten Studien in Pflanzen zeigt, dass mit Abstand am häufigsten die klassische Genschere CRISPR/Cas9 verwendet wird. Sie wird nach wie vor hauptsächlich mit Hilfe des alten Gentechnikverfahrens, der *Agrobacterium*-Transformation, in die pflanzlichen Zellen eingeschleust. Am häufigsten werden SDN-1-Veränderungen mit der Genschere bewirkt, die zu einem großen Anteil auch zu komplexen Veränderungen des Erbguts führen.

Viele Weiterentwicklungen der Genschere, die in diesem Hintergrundpapier beschrieben wurden, sind der Grundlagenforschung zuzuordnen und noch nicht für einen routinierten Einsatz im Pflanzenlabor einsatzbereit. Es handelt sich vielmehr um Machbarkeitsstudien, denen häufig eine umfassende Risikoanalyse fehlt. Zum anderen zeigte sich aber bereits, dass mit scheinbar kleinen SDN-1-Eingriffen im Erbgut von Pflanzen komplexe Veränderungen herbeigeführt werden können. Auch solche Pflanzen müssen eine umfassende Risikobewertung durchlaufen, da einerseits in andere biochemische Prozesse der Zelle eingegriffen werden kann und andererseits bereits mehrfach von ungewollten Veränderungen des Erbguts durch den Einsatz der Genschere und der alten Gentechnik berichtet wurde. Beide Aspekte, also der ungewollte Eingriff in andere biochemische Prozesse sowie technische Fehler der Genschere und der alten Gentechnik, werden im Hintergrundpapier über die Risiken von CRISPR/Cas näher beschrieben.

Referenzen

1. Abe F, Haque E, Hisano H, Tanaka T, Kamiya Y, Mikami M, Kawaura K, Endo M, Onishi K, Hayashi T, Sato K (2019) Genome-Edited Triple-Recessive Mutation Alters Seed Dormancy in Wheat. *Cell Rep* 28 (5):1362-1369.e1364. doi:10.1016/j.celrep.2019.06.090
2. Ozseyhan ME, Kang J, Mu X, Lu C (2018) Mutagenesis of the FAE1 genes significantly changes fatty acid composition in seeds of *Camelina sativa*. *Plant Physiol Biochem* 123:1-7. doi:10.1016/j.plaphy.2017.11.021
3. Zhang Z, Ge X, Luo X, Wang P, Fan Q, Hu G, Xiao J, Li F, Wu J (2018) Simultaneous Editing of Two Copies of Gh14-3-3d Confers Enhanced Transgene-Clean Plant Defense Against *Verticillium dahliae* in Allotetraploid Upland Cotton. *Front Plant Sci* 9:842. doi:10.3389/fpls.2018.00842
4. Sanchez-Leon S, Gil-Humanes J, Ozuna CV, Gimenez MJ, Sousa C, Voytas DF, Barro F (2018) Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol J* 16 (4):902-910. doi:10.1111/pbi.12837
5. Li A, Jia S, Yobi A, Ge Z, Sato SJ, Zhang C, Angelovici R, Clemente TE, Holding DR (2018) Editing of an Alpha-Kafirin Gene Family Increases Digestibility and Protein Quality in Sorghum. *Plant Physiol* 177 (4):1425-1438. doi:10.1104/pp.18.00200
6. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339 (6121):819-823. doi:10.1126/science.1231143
7. Stuttmann J, Barthel K, Martin P, Ordon J, Erickson JL, Herr R, Ferik F, Kretschmer C, Berner T, Keilwagen J, Marillonnet S, Bonas U (2021) Highly efficient multiplex editing: One-shot generation of 8x *Nicotiana benthamiana* and 12x *Arabidopsis* mutants. *The Plant Journal* n/a (n/a). doi:<https://doi.org/10.1111/tpj.15197>
8. Wang W, Akhunova, A, Chao, S, Trick H, Akhunov, E (2018) Transgenerational CRISPR-Cas9 activity facilitates multiplex gene editing in allopolyploid wheat. *The CRISPR Journal* 1 (1). doi:10.1089/crispr.2017.0010
9. Shen L, Hua Y, Fu Y, Li J, Liu Q, Jiao X, Xin G, Wang J, Wang X, Yan C, Wang K (2017) Rapid generation of genetic diversity by multiplex CRISPR/Cas9 genome editing in rice. *Sci China Life Sci* 60 (5):506-515. doi:10.1007/s11427-017-9008-8
10. Zhang Y, Ren Q, Tang X, Liu S, Malzahn AA, Zhou J, Wang J, Yin D, Pan C, Yuan M, Huang L, Yang H, Zhao Y, Fang Q, Zheng X, Tian L, Cheng Y, Le Y, McCoy B, Franklin L, Selengut JD, Mount SM, Que Q, Zhang Y, Qi Y (2021) Expanding the scope of plant genome engineering with Cas12a orthologs and highly multiplexable editing systems. *Nature Communications* 12 (1):1944. doi:10.1038/s41467-021-22330-w
11. Cai Y, Chen L, Sun S, Wu C, Yao W, Jiang B, Han T, Hou W (2018) CRISPR/Cas9-Mediated Deletion of Large Genomic Fragments in Soybean. *Int J Mol Sci* 19 (12). doi:10.3390/ijms19123835
12. Gao W, Long L, Tian X, Xu F, Liu J, Singh PK, Botella JR, Song C (2017) Genome Editing in Cotton with the CRISPR/Cas9 System. *Frontiers in plant science* 8:1364-1364. doi:10.3389/fpls.2017.01364
13. Zhou X, Jiang G, Yang L, Qiu L, He P, Nong C, Wang Y, He Y, Xing Y (2018) Gene diagnosis and targeted breeding for blast-resistant Kongyu 131 without changing regional adaptability. *J Genet Genomics* 45 (10):539-547. doi:10.1016/j.jgg.2018.08.003
14. Lin T, Zhu G, Zhang J, Xu X, Yu Q, Zheng Z, Zhang Z, Lun Y, Li S, Wang X, Huang Z, Li J, Zhang C, Wang T, Zhang Y, Wang A, Zhang Y, Lin K, Li C, Xiong G, Xue Y, Mazzucato A, Causse M, Fei Z, Giovannoni JJ, Chetelat RT, Zamir D, Städler T, Li J, Ye Z, Du Y, Huang S (2014) Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. *Nature Genetics* 46 (11):1220-1226. doi:10.1038/ng.3117
15. Roldan MVG, Perilleux C, Morin H, Huerga-Fernandez S, Latrasse D, Benhamed M, Bendahmane A (2017) Natural and induced loss of function mutations in SIMBP21 MADS-box gene led to jointless-2 phenotype in tomato. *Sci Rep* 7 (1):4402. doi:10.1038/s41598-017-04556-1
16. Schmidt C, Fransz P, Rönspies M, Dreissig S, Fuchs J, Heckmann S, Houben A, Puchta H (2020) Changing local recombination patterns in *Arabidopsis* by CRISPR/Cas mediated chromosome engineering. *Nature Communications* 11 (1):4418. doi:10.1038/s41467-020-18277-z

17. International Barley Genome Sequencing C, Mayer KF, Waugh R, Brown JW, Schulman A, Langridge P, Platzer M, Fincher GB, Muehlbauer GJ, Sato K, Close TJ, Wise RP, Stein N (2012) A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature* 491 (7426):711-716. doi:10.1038/nature11543
18. Bauer E, Falque M, Walter H, Bauland C, Camisan C, Campo L, Meyer N, Ranc N, Rincant R, Schipprack W, Altmann T, Flament P, Melchinger AE, Menz M, Moreno-González J, Ouzunova M, Revilla P, Charcosset A, Martin OC, Schön CC (2013) Intraspecific variation of recombination rate in maize. *Genome Biol* 14 (9):R103. doi:10.1186/gb-2013-14-9-r103
19. Filler Hayut S, Melamed Bessudo C, Levy AA (2017) Targeted recombination between homologous chromosomes for precise breeding in tomato. *Nature Communications* 8 (1):15605. doi:10.1038/ncomms15605
20. Taagen E, Bogdanove AJ, Sorrells ME (2020) Counting on Crossovers: Controlled Recombination for Plant Breeding. *Trends Plant Sci* 25 (5):455-465. doi:10.1016/j.tplants.2019.12.017
21. Monroe JG, Srikant T, Carbonell-Bejerano P, Exposito-Alonso M, Weng M-L, Rutter MT, Fenster CB, Weigel D (2020) Mutation bias shapes gene evolution in *Arabidopsis thaliana*. bioRxiv:2020.2006.2017.156752. doi:10.1101/2020.06.17.156752
22. Belfield EJ, Ding ZJ, Jamieson FJC, Visscher AM, Zheng SJ, Mithani A, Harberd NP (2018) DNA mismatch repair preferentially protects genes from mutation. *Genome Res* 28 (1):66-74. doi:10.1101/gr.219303.116
23. Supek F, Lehner B (2015) Differential DNA mismatch repair underlies mutation rate variation across the human genome. *Nature* 521 (7550):81-84. doi:10.1038/nature14173
24. Huang Y, Gu L, Li GM (2018) H3K36me3-mediated mismatch repair preferentially protects actively transcribed genes from mutation. *J Biol Chem* 293 (20):7811-7823. doi:10.1074/jbc.RA118.002839
25. Sun L, Zhang Y, Zhang Z, Zheng Y, Du L, Zhu B (2016) Preferential Protection of Genetic Fidelity within Open Chromatin by the Mismatch Repair Machinery. *J Biol Chem* 291 (34):17692-17705. doi:10.1074/jbc.M116.719971
26. Brinkman EK, Chen T, de Haas M, Holland HA, Akhtar W, van Steensel B (2018) Kinetics and Fidelity of the Repair of Cas9-Induced Double-Strand DNA Breaks. *Mol Cell* 70 (5):801-813 e806. doi:10.1016/j.molcel.2018.04.016
27. Jayakodi M, Padmarasu S, Haberer G, Bonthala VS, Gundlach H, Monat C, Lux T, Kamal N, Lang D, Himmelbach A, Ens J, Zhang X-Q, Angessa TT, Zhou G, Tan C, Hill C, Wang P, Schreiber M, Boston LB, Plott C, Jenkins J, Guo Y, Fiebig A, Budak H, Xu D, Zhang J, Wang C, Grimwood J, Schmutz J, Guo G, Zhang G, Mochida K, Hirayama T, Sato K, Chalmers KJ, Langridge P, Waugh R, Pozniak CJ, Scholz U, Mayer KFX, Spannagl M, Li C, Mascher M, Stein N (2020) The barley pan-genome reveals the hidden legacy of mutation breeding. *Nature* 588 (7837):284-289. doi:10.1038/s41586-020-2947-8
28. Walkowiak S, Gao L, Monat C, Haberer G, Kassa MT, Brinton J, Ramirez-Gonzalez RH, Kolodziej MC, Delorean E, Thambugala D, Klymiuk V, Byrns B, Gundlach H, Bandi V, Siri JN, Nilsen K, Aquino C, Himmelbach A, Copetti D, Ban T, Venturini L, Bevan M, Clavijo B, Koo D-H, Ens J, Wiebe K, N'Diaye A, Fritz AK, Gutwin C, Fiebig A, Fosker C, Fu BX, Accinelli GG, Gardner KA, Fradgley N, Gutierrez-Gonzalez J, Halstead-Nussloch G, Hatakeyama M, Koh CS, Deek J, Costamagna AC, Fobert P, Heavens D, Kanamori H, Kawaura K, Kobayashi F, Krasileva K, Kuo T, McKenzie N, Murata K, Nabeka Y, Paape T, Padmarasu S, Percival-Alwyn L, Kagale S, Scholz U, Sese J, Juliana P, Singh R, Shimizu-Inatsugi R, Swarbreck D, Cockram J, Budak H, Tameshige T, Tanaka T, Tsuji H, Wright J, Wu J, Steuernagel B, Small I, Cloutier S, Keeble-Gagnère G, Muehlbauer G, Tibbets J, Nasuda S, Melonek J, Hucl PJ, Sharpe AG, Clark M, Legg E, Bharti A, Langridge P, Hall A, Uauy C, Mascher M, Krattinger SG, Handa H, Shimizu KK, Distelfeld A, Chalmers K, Keller B, Mayer KFX, Poland J, Stein N, McCartney CA, Spannagl M, Wicker T, Pozniak CJ (2020) Multiple wheat genomes reveal global variation in modern breeding. *Nature* 588 (7837):277-283. doi:10.1038/s41586-020-2961-x
29. Della Coletta R, Qiu Y, Ou S, Hufford MB, Hirsch CN (2021) How the pan-genome is changing crop genomics and improvement. *Genome Biology* 22 (1):3. doi:10.1186/s13059-020-02224-8

30. Gao L, Gonda I, Sun H, Ma Q, Bao K, Tieman DM, Burzynski-Chang EA, Fish TL, Stromberg KA, Sacks GL, Thannhauser TW, Foolad MR, Diez MJ, Blanca J, Canizares J, Xu Y, van der Knaap E, Huang S, Klee HJ, Giovannoni JJ, Fei Z (2019) The tomato pan-genome uncovers new genes and a rare allele regulating fruit flavor. *Nat Genet* 51 (6):1044-1051. doi:10.1038/s41588-019-0410-2
31. Zsogon A, Cermak T, Naves ER, Notini MM, Edel KH, Weinl S, Freschi L, Voytas DF, Kudla J, Peres LEP (2018) *De novo* domestication of wild tomato using genome editing. *Nat Biotechnol* 36:1211-1216. doi:10.1038/nbt.4272
32. Yu H, Lin T, Meng X, Du H, Zhang J, Liu G, Chen M, Jing Y, Kou L, Li X, Gao Q, Liang Y, Liu X, Fan Z, Liang Y, Cheng Z, Chen M, Tian Z, Wang Y, Chu C, Zuo J, Wan J, Qian Q, Han B, Zuccolo A, Wing RA, Gao C, Liang C, Li J (2021) A route to *de novo* domestication of wild allotetraploid rice. *Cell* 184 (5):1156-1170.e1114. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.013>
33. Wang DR (2021) Road map for domesticating multi-genome rice using gene editing. *Nature* 591 (7851):537-538. doi:10.1038/d41586-021-00589-9
34. Lemmon ZH, Reem NT, Dalrymple J, Soyk S, Swartwood KE, Rodriguez-Leal D, Van Eck J, Lippman ZB (2018) Rapid improvement of domestication traits in an orphan crop by genome editing. *Nat Plants* 4 (10):766-770. doi:10.1038/s41477-018-0259-x
35. Li T, Yang X, Yu Y, Si X, Zhai X, Zhang H, Dong W, Gao C, Xu C (2018) Domestication of wild tomato is accelerated by genome editing. *Nat Biotechnol*. doi:10.1038/nbt.4273
36. Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, Packer MS, Badran AH, Bryson DI, Liu DR (2017) Programmable base editing of A*T to G*C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature* 551 (7681):464-471. doi:10.1038/nature24644
37. Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR (2016) Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* 533 (7603):420-424. doi:10.1038/nature17946
38. Kang BC, Yun JY, Kim ST, Shin Y, Ryu J, Choi M, Woo JW, Kim JS (2018) Precision genome engineering through adenine base editing in plants. *Nat Plants* 4 (7):427-431. doi:10.1038/s41477-018-0178-x
39. Yan F, Kuang Y, Ren B, Wang J, Zhang D, Lin H, Yang B, Zhou X, Zhou H (2018) Highly Efficient A-T to G-C Base Editing by Cas9n-Guided tRNA Adenosine Deaminase in Rice. *Mol Plant* 11 (4):631-634. doi:10.1016/j.molp.2018.02.008
40. Li J, Sun Y, Du J, Zhao Y, Xia L (2017) Generation of Targeted Point Mutations in Rice by a Modified CRISPR/Cas9 System. *Molecular Plant* 10 (3):526-529. doi:<https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.12.001>
41. Shimatani Z, Fujikura U, Ishii H, Matsui Y, Suzuki M, Ueke Y, Taoka KI, Terada R, Nishida K, Kondo A (2018) Inheritance of co-edited genes by CRISPR-based targeted nucleotide substitutions in rice. *Plant Physiol Biochem* 131:78-83. doi:10.1016/j.plaphy.2018.04.028
42. Shimatani Z, Kashojiya S, Takayama M, Terada R, Arazoe T, Ishii H, Teramura H, Yamamoto T, Komatsu H, Miura K, Ezura H, Nishida K, Ariizumi T, Kondo A (2017) Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. *Nat Biotechnol* 35 (5):441-443. doi:10.1038/nbt.3833
43. Modrzejewski D, Hartung, F., Sprink, T., Menz, J., Kohl, C., Delventhal, R., Wilhelm, R. (2020) Aktualisierung der Übersicht über Nutz- und Zierpflanzen, die mittels neuer molekularbiologischer Techniken für die Bereiche Ernährung, Landwirtschaft und Gartenbau erzeugt wurden – marktorientierte Anwendungen. https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/DE/Landwirtschaft/Gruene-Gentechnik/NMT_Uebersicht-Zier-Nutzpflanzen.pdf?__blob=publicationFile&v=3.
44. Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, Sousa AA, Koblan LW, Levy JM, Chen PJ, Wilson C, Newby GA, Raguram A, Liu DR (2019) Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* 576 (7785):149-157. doi:10.1038/s41586-019-1711-4
45. Butt H, Rao GS, Sedeeq K, Aman R, Kamel R, Mahfouz M (2020) Engineering herbicide resistance via prime editing in rice. *Plant Biotechnol J*. doi:10.1111/pbi.13399
46. Hua K, Jiang Y, Tao X, Zhu JK (2020) Precision genome engineering in rice using prime editing system. *Plant Biotechnol J*. doi:10.1111/pbi.13395

47. Lu Y, Tian Y, Shen R, Yao Q, Zhong D, Zhang X, Zhu J-K (2021) Precise genome modification in tomato using an improved prime editing system. *Plant Biotechnology Journal* 19 (3):415-417. doi:<https://doi.org/10.1111/pbi.13497>
48. Huang TK, Puchta H (2021) Novel CRISPR/Cas applications in plants: from prime editing to chromosome engineering. *Transgenic Res.* doi:10.1007/s11248-021-00238-x
49. Lin Q, Zong Y, Xue C, Wang S, Jin S, Zhu Z, Wang Y, Anzalone AV, Raguram A, Doman JL, Liu DR, Gao C (2020) Prime genome editing in rice and wheat. *Nature Biotechnology* 38 (5):582-585. doi:10.1038/s41587-020-0455-x
50. Gao C (2021) Genome engineering for crop improvement and future agriculture. *Cell* 184 (6):1621-1635. doi:10.1016/j.cell.2021.01.005
51. Lin Q, Jin S, Zong Y, Yu H, Zhu Z, Liu G, Kou L, Wang Y, Qiu J-L, Li J, Gao C (2021) High-efficiency prime editing with optimized, paired pegRNAs in plants. *Nature Biotechnology*. doi:10.1038/s41587-021-00868-w
52. Jin S, Lin Q, Luo Y, Zhu Z, Liu G, Li Y, Chen K, Qiu J-L, Gao C (2021) Genome-wide specificity of prime editors in plants. *Nature Biotechnology*. doi:10.1038/s41587-021-00891-x
53. Kim DY, Moon SB, Ko J-H, Kim Y-S, Kim D (2020) Unbiased investigation of specificities of prime editing systems in human cells. *Nucleic Acids Research* 48 (18):10576-10589. doi:10.1093/nar/gkaa764
54. Hilton IB, D'Ippolito AM, Vockley CM, Thakore PI, Crawford GE, Reddy TE, Gersbach CA (2015) Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nat Biotechnol* 33 (5):510-517. doi:10.1038/nbt.3199
55. Huang YH, Su J, Lei Y, Brunetti L, Gundry MC, Zhang X, Jeong M, Li W, Goodell MA (2017) DNA epigenome editing using CRISPR-Cas SunTag-directed DNMT3A. *Genome Biol* 18 (1):176. doi:10.1186/s13059-017-1306-z
56. Fal K, Tomkova D, Vachon G, Chabouté ME, Berr A, Carles CC (2021) Chromatin Manipulation and Editing: Challenges, New Technologies and Their Use in Plants. *Int J Mol Sci* 22 (2). doi:10.3390/ijms22020512
57. Gallego-Bartolomé J, Gardiner J, Liu W, Papikian A, Ghoshal B, Kuo HY, Zhao JM-C, Segal DJ, Jacobsen SE (2018) Targeted DNA demethylation of the *Arabidopsis* genome using the human TET1 catalytic domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115 (9):E2125-E2134. doi:10.1073/pnas.1716945115
58. Lee JE, Neumann M, Duro DI, Schmid M (2019) CRISPR-based tools for targeted transcriptional and epigenetic regulation in plants. *PLoS One* 14 (9):e0222778. doi:10.1371/journal.pone.0222778
59. Roca Paixão JF, Gillet FX, Ribeiro TP, Bournaud C, Lourenço-Tessutti IT, Noriega DD, Melo BP, de Almeida-Engler J, Grossi-de-Sa MF (2019) Improved drought stress tolerance in *Arabidopsis* by CRISPR/dCas9 fusion with a Histone Acetyltransferase. *Sci Rep* 9 (1):8080. doi:10.1038/s41598-019-44571-y
60. Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, Lim WA (2013) Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell* 152 (5):1173-1183. doi:10.1016/j.cell.2013.02.022
61. Lowder LG, Zhang D, Baltus NJ, Paul JW, 3rd, Tang X, Zheng X, Voytas DF, Hsieh TF, Zhang Y, Qi Y (2015) A CRISPR/Cas9 toolbox for multiplexed plant genome editing and transcriptional regulation. *Plant Physiol* 169 (2):971-985. doi:10.1104/pp.15.00636
62. Gilbert LA, Horlbeck MA, Adamson B, Villalta JE, Chen Y, Whitehead EH, Guimaraes C, Panning B, Ploegh HL, Bassik MC, Qi LS, Kampmann M, Weissman JS (2014) Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. *Cell* 159 (3):647-661. doi:10.1016/j.cell.2014.09.029
63. Alok A, Sandhya D, Jogam P, Rodrigues V, Bhati KK, Sharma H, Kumar J (2020) The Rise of the CRISPR/Cpf1 System for Efficient Genome Editing in Plants. *Front Plant Sci* 11:264. doi:10.3389/fpls.2020.00264
64. Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Essletzbichler P, Han S, Joung J, Belanto JJ, Verdine V, Cox DBT, Kellner MJ, Regev A, Lander ES, Voytas DF, Ting AY, Zhang F (2017) RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature* 550 (7675):280-284. doi:10.1038/nature24049

65. Collias D, Beisel CL (2021) CRISPR technologies and the search for the PAM-free nuclease. *Nature Communications* 12 (1):555. doi:10.1038/s41467-020-20633-y
66. Murugan K, Suresh SK, Seetharam AS, Severin AJ, Sashital DG (2021) Systematic in vitro specificity profiling reveals nicking defects in natural and engineered CRISPR–Cas9 variants. *Nucleic Acids Research*. doi:10.1093/nar/gkab163
67. Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, Joung J, Slaymaker IM, Cox DB, Shmakov S, Makarova KS, Semenova E, Minakhin L, Severinov K, Regev A, Lander ES, Koonin EV, Zhang F (2016) C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science* 353 (6299):aaf5573. doi:10.1126/science.aaf5573
68. Cox DBT, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Franklin B, Kellner MJ, Joung J, Zhang F (2017) RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science* 358 (6366):1019-1027. doi:10.1126/science.aaq0180
69. Aman R, Ali Z, Butt H, Mahas A, Aljedaani F, Khan MZ, Ding S, Mahfouz M (2018) RNA virus interference via CRISPR/Cas13a system in plants. *Genome Biol* 19 (1):1. doi:10.1186/s13059-017-1381-1
70. Mahas A, Aman R, Mahfouz M (2019) CRISPR-Cas13d mediates robust RNA virus interference in plants. *Genome Biol* 20 (1):263. doi:10.1186/s13059-019-1881-2
71. Ellison EE, Nagalakshmi U, Gamo ME, Huang PJ, Dinesh-Kumar S, Voytas DF (2020) Multiplexed heritable gene editing using RNA viruses and mobile single guide RNAs. *Nat Plants* 6 (6):620-624. doi:10.1038/s41477-020-0670-y
72. Budhagatapalli N, Halbach T, Hiekel S, Buchner H, Muller AE, Kumlehn J (2020) Site-directed mutagenesis in bread and durum wheat via pollination by cas9/guide RNA-transgenic maize used as haploidy inducer. *Plant Biotechnol J*. doi:10.1111/pbi.13415
73. Maher MF, Nasti RA, Vollbrecht M, Starker CG, Clark MD, Voytas DF (2020) Plant gene editing through de novo induction of meristems. *Nat Biotechnol* 38 (1):84-89. doi:10.1038/s41587-019-0337-2
74. Liu Y, Luo W, Linghu Q, Abe F, Hisano H, Sato K, Kamiya Y, Kawaura K, Onishi K, Endo M, Toki S, Hamada H, Nagira Y, Taoka N, Imai R (2021) In planta Genome Editing in Commercial Wheat Varieties. *Frontiers in Plant Science* 12 (388). doi:10.3389/fpls.2021.648841
75. Hamada H, Liu Y, Nagira Y, Miki R, Taoka N, Imai R (2018) Biolistic-delivery-based transient CRISPR/Cas9 expression enables in planta genome editing in wheat. *Sci Rep* 8 (1):14422. doi:10.1038/s41598-018-32714-6
76. Liu J, Nannas NJ, Fu F-F, Shi J, Aspinwall B, Parrott WA, Dawe RK (2019) Genome-Scale Sequence Disruption Following Biolistic Transformation in Rice and Maize. *The Plant cell* 31 (2):368-383. doi:10.1105/tpc.18.00613
77. Svitashv SK, Pawlowski WP, Makarevitch I, Plank DW, Somers DA (2002) Complex transgene locus structures implicate multiple mechanisms for plant transgene rearrangement. *Plant J* 32 (4):433-445. doi:10.1046/j.1365-313x.2002.01433.x
78. Simon S, Otto M, Engelhard M (2018) Scan the horizon for unprecedented risks. *Science* 362 (6418):1007-1008. doi:10.1126/science.aav7568
79. Reeves RG, Voeneky S, Caetano-Anolles D, Beck F, Boete C (2018) Agricultural research, or a new bioweapon system? *Science* 362 (6410):35-37. doi:10.1126/science.aat7664
80. Modrzejewski D, Hartung, F., Sprink, T., Krause, D., Kohl, C., Wilhelm R. (2019) What is the available evidence for the range of applications of genome-editing as a new tool for plant trait modification and the potential occurrence of associated off-target effects: a systematic map. *Environ Evid* 8 (27). doi:10.1186/s13750-019-0171-5
81. Nonaka S, Arai C, Takayama M, Matsukura C, Ezura H (2017) Efficient increase of γ -aminobutyric acid (GABA) content in tomato fruits by targeted mutagenesis. *Scientific Reports* 7 (1):7057. doi:10.1038/s41598-017-06400-y
82. Shi QS, Wang KQ, Li YL, Zhou L, Xiong SX, Han Y, Zhang YF, Yang NY, Yang ZN, Zhu J (2018) OsPKS1 is required for sexine layer formation, which shows functional conservation between rice and Arabidopsis. *Plant Sci* 277:145-154. doi:10.1016/j.plantsci.2018.08.009
83. Zou T, He, Z., Qu, L. et al. (2017) Knockout of OsACOS12 caused male sterility in rice. *Mol Breeding* 37 (126). doi:<https://doi.org/10.1007/s11032-017-0722-9>

84. Schachtsiek J, Stehle F (2019) Nicotine-free, nontransgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) edited by CRISPR-Cas9. *Plant Biotechnol J* 17 (12):2228-2230. doi:10.1111/pbi.13193
85. Fister AS, Landherr L, Maximova SN, Gultinan MJ (2018) Transient Expression of CRISPR/Cas9 Machinery Targeting TcNPR3 Enhances Defense Response in *Theobroma cacao*. *Front Plant Sci* 9:268. doi:10.3389/fpls.2018.00268
86. Kannan B, Jung JH, Moxley GW, Lee SM, Altpeter F (2018) TALEN-mediated targeted mutagenesis of more than 100 COMT copies/alleles in highly polyploid sugarcane improves saccharification efficiency without compromising biomass yield. *Plant Biotechnol J* 16 (4):856-866. doi:10.1111/pbi.12833
87. Jiang WZ, Henry IM, Lynagh PG, Comai L, Cahoon EB, Weeks DP (2017) Significant enhancement of fatty acid composition in seeds of the allohexaploid, *Camelina sativa*, using CRISPR/Cas9 gene editing. *Plant Biotechnol J* 15 (5):648-657. doi:10.1111/pbi.12663
88. Wilson FM, Harrison K, Armitage AD, Simkin AJ, Harrison RJ (2019) CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of phytoene desaturase in diploid and octoploid strawberry. *Plant Methods* 15:45. doi:10.1186/s13007-019-0428-6