

Biosafety Briefing

Dezembro de 2020

TWN
Third World Network
www.twn.my

GeneWatch
 UK

Por que os organismos submetidos a técnicas de edição do genoma não são excluídos do Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança

Autora: **Eva Sirinathsinghji**

Técnicas novas e emergentes de edição do genoma estão sendo promovidas como métodos mais rápidos de engenharia genética para efetuar mudanças na informação e expressão genética em regiões específicas do genoma. Estas técnicas incluem as repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas (CRISPR), meganucleases (MNs), nucleases de dedos de zinco (ZFNs), nucleases efetoras semelhantes a ativadores de transcrição (TALENs) e mutagênese dirigida por oligonucleotídeos (ODM). O desenvolvimento de tais técnicas tem provocado intensos debates sobre (1) se elas são regulamentadas pela legislação atual sobre biossegurança, (2) se são seguras e (3) se devem ser submetidas aos mesmos procedimentos de avaliação e

gestão de riscos que os organismos vivos modificados (OVMs).

Um argumento proposto por aqueles que procuram excluir da regulamentação os organismos desenvolvidos com técnicas de edição do genoma, inclusive ao nível nacional, é que esses organismos não se enquadram na definição de OVM do Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança da Convenção sobre Diversidade Biológica (CBD).

Este artigo visa demonstrar que as tecnologias e aplicações de edição do genoma utilizadas atualmente, incluindo todas as técnicas baseadas em métodos de CRISPR, se enquadram claramente na definição de OVM do Proto-

TWN A REDE DO TERCEIRO MUNDO (THIRD WORLD NETWORK, TWN) é uma organização internacional independente sem fins lucrativos de investigação e ativismo que procura promover uma maior articulação das necessidades, aspirações e direitos dos povos do Sul e fomentar um desenvolvimento justo, equitativo e ecológico.

Morada: 131 Jalan Macalister, 10400 Penang, MALÁSIA **Tel:** 60-4-2266728/2266159

Fax: 60-4-2264505 **E-mail:** twn@twnetwork.org **Website:** www.twn.my

GeneWatch
 UK

GENEWATCH UK é um grupo de interesse público sem fins lucrativos dedicado à pesquisa de políticas. O grupo investiga como a ciência e as tecnologias da genética afetarão a nossa alimentação, saúde, agricultura, meio ambiente e sociedade.

Endereço: 53 Milton Rd, Cambridge CB4 1XA, REINO UNIDO **Tel:** +44 (0)330 0010507

Email: mail@genewatch.org **Website:** www.genewatch.org

O conteúdo desta publicação pode ser republicado ou reutilizado gratuitamente para fins não comerciais, exceto quando indicado de outra forma. Esta publicação está registada sob uma Licença Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0.

colo, quer envolvam a inserção, deleção ou edição de sequências genômicas.

A definição de “organismo vivo modificado” do Protocolo de Cartagena

O artigo 3 do Protocolo de Cartagena apresenta três definições inter-relacionadas, que devem ser lidas em conjunto: “organismo vivo modificado”, “organismo vivo” e “biotecnologia moderna”.

Por “organismo vivo modificado” entende-se “qualquer organismo vivo que tenha uma combinação de material genético inédita obtida por meio do uso da biotecnologia moderna.”

Tal definição de organismo vivo modificado no Protocolo visa incluir apenas os organismos vivos que:

- contêm combinações inéditas de material genético, e
- foram produzidos pelo uso de técnicas da biotecnologia moderna (parágrafo 208, *An Explanatory Guide to the Cartagena Protocol on Biosafety*: Mackenzie et al., 2003).

Por “organismo vivo” entende-se “qualquer entidade biológica capaz de transferir ou replicar material genético, inclusive os organismos estéreis, os vírus e os viroides.”

Embora o Protocolo de Cartagena não defina “material genético”, tal definição é encontrada na CDB: “todo material de origem vegetal, animal, microbiana ou outra que contenha unidades funcionais de hereditariedade”. As unidades funcionais de hereditariedade são entendidas como ácidos nucleicos contendo informação genética. No contexto do Protocolo de Cartagena, material genético pode ser entendido como os ácidos nucleicos que contenham unidades funcionais de hereditariedade (parágrafo 201, *Explanatory Guide*).

Uma “combinação inédita de material genético” pode ser considerada como uma combinação cuja existência não era conhecida antes do momento em que foi produzida pela primeira vez. Juntamente com a definição de material genético da CDB, esta expressão pode então ser entendida como uma combinação inédita de ácidos nucleicos que contenham unidades funcionais de hereditariedade (parágrafo 209,

Explanatory Guide). É importante notar que a combinação inédita se refere apenas a uma combinação de material genético, mesmo que não resulte em uma mudança observável (parágrafo 210, *Explanatory Guide*).

Uma combinação inédita pode surgir através de uma nova forma de unidade funcional de hereditariedade, por exemplo, resultante de uma alteração que modifique a sequência geral de nucleotídeos dentro da unidade, seja pela alteração, inserção ou deleção de um ou mais nucleotídeos. Também pode surgir de um novo arranjo de unidades funcionais de hereditariedade, por exemplo, pela introdução de material genético de uma espécie diferente ou pelo rearranjo de material genético da mesma espécie. Uma combinação inédita pode surgir de uma única alteração em uma sequência de nucleotídeos ou de modificações muito maiores (parágrafos 211-212, *Explanatory Guide*).

De acordo com o Protocolo de Cartagena, a combinação inédita de material genético deve ser “obtida por meio do uso da biotecnologia moderna”. Este é um critério fundamental para a definição de OVM. O fato de um organismo ser ou não um OVM segundo o Protocolo depende da utilização da “biotecnologia moderna” para criar uma combinação inédita de material genético.

“Biotecnologia moderna” é definida no Protocolo de Cartagena como:

- a. a aplicação de técnicas *in vitro* de ácidos nucleicos, incluindo DNA recombinante e injeção direta de ácidos nucleicos em células ou organelas, ou
- b. a fusão de células de organismos que não pertencem à mesma família taxonômica, que superem as barreiras naturais da fisiologia da reprodução ou da recombinação e que não sejam técnicas utilizadas na reprodução e seleção tradicionais.”

Portanto, a definição inclui mas não está limitada a técnicas *in vitro* de ácidos nucleicos aplicadas para a inserção, deleção e alteração de material genético (parágrafo 215, *Explanatory Guide*). As duas qualificações são a necessidade de superar as barreiras naturais da fisiologia da reprodução ou recombinação e o fato de não serem técnicas utilizadas na reprodução e seleção tradicionais.

Em resumo, para que um organismo vivo seja definido como um OVM nos termos do Protocolo de Cartagena, deve atender a três critérios:

1. o organismo contém combinações inéditas de material genético;
2. foi produzido pelo uso de técnicas da biotecnologia moderna (incluindo a aplicação de técnicas *in vitro* de ácidos nucleicos, ou a fusão de células de organismos que não pertencem à mesma família taxonômica);
3. as técnicas da biotecnologia moderna utilizadas superam as barreiras naturais da fisiologia da reprodução ou recombinação e não são técnicas utilizadas na reprodução e seleção tradicionais.

Critério 1: o organismo contém combinações inéditas de material genético

Para sistemas baseados no método CRISPR, a técnica envolve o uso de sequências de RNA guia (RNAg) produzidas sinteticamente de modo a ter como alvo uma sequência de DNA (ou RNA) a ser 'editada'. O RNAg direciona então a enzima de corte de DNA Cas9, ou endonuclease, para a sequência de interesse, onde ela corta o DNA. Com isto, o mecanismo de reparo do DNA da célula é ativado, e o DNA é reparado. Se o processo de reparo resultar na inserção ou deleção de pequenos pedaços de material genético ("indels"), o resultado é conhecido como uma aplicação de SDN-1 (*site-directed nuclease*). As aplicações de SDN-1 são usadas para destruir genes de forma imprecisa. Por outro lado, se o objetivo é "editar" um gene, também é introduzido DNA adicional que serve como molde para a alteração desejada, podendo então ser copiado para o gene do organismo-alvo. Este método é denominado SDN-2. Os sistemas de CRISPR também estão sendo usados para inserir DNA transgênico em um local específico, introduzindo um molde de DNA junto com a maquinaria de CRISPR, o que é chamado SDN-3.

Da mesma forma, TALENs, MNs e ZFNs podem ser utilizados para realizar aplicações de SDN-1, 2 e 3 para 'indels', edições ou inserções de sequências de DNA transgênico. Entretanto, são diferentes dos sistemas de CRISPR, pois não utilizam RNAg para visar sequências específicas de DNA; em vez disso, são enzimas proteicas com sítios de reconhe-

cimento de DNA para se ligar a sequências de DNA de interesse, cortando-as.

A ODM, por outro lado, envolve a introdução de pequenos trechos de material genético, chamados oligonucleotídeos, que podem ser de DNA ou híbridos de DNA/RNA. Estes oligonucleotídeos são idênticos à sequência-alvo a ser modificada, exceto pela alteração desejada a ser introduzida. Estes moldes de DNA se ligam à sequência-alvo, e então a maquinaria de reparo natural da célula reconhece a discrepância específica entre a base de seu DNA próprio e a do molde introduzido.

O objetivo de todas as técnicas de edição do genoma é introduzir alterações genéticas previamente inexistentes, a fim de provocar a expressão de novas características, ou traços, nos organismos vivos, independentemente da inserção ou não de DNA. Quer sejam empregadas para gerar 'indels', 'edições' ou 'inserções', todas essas técnicas visam criar novos traços pela formação de combinações inéditas de DNA, não importando se o DNA transgênico foi ou não inserido.

Portanto, está claro que todas as técnicas de edição do genoma produzem uma combinação inédita de material genético, atendendo assim ao critério 1.

Critério 2: uso da biotecnologia moderna (incluindo a aplicação de técnicas in vitro de ácidos nucleicos ou a fusão de células de organismos que não pertencem à mesma família taxonômica)

Atualmente, a grande maioria dos métodos de edição do genoma envolve a aplicação de técnicas de ácidos nucleicos, utilizando RNA ou DNA em alguma etapa do processo.

As técnicas baseadas em CRISPR (incluindo as duplas nickases e os 'editores' de bases) podem ser realizadas de várias maneiras, todas elas envolvendo a introdução dos ácidos nucleicos DNA ou RNA. A abordagem clássica consiste em introduzir plasmídeos de DNA que codificam a maquinaria CRISPR. O plasmídeo pode ser introduzido permanentemente no genoma do organismo-alvo, sendo removido posteriormente por retrocruzamento, ou ser expressado de forma transitória. Também foram desenvolvidas técnicas mais recentes que não utilizam o DNA, envolvendo

a introdução de moléculas de RNA mensageiro que codificam a maquinaria CRISPR ou a introdução direta de ribonucleoproteínas, isto é, a proteína Cas9 junto com a molécula de RNA guia (Metje-Sprink et al., 2019).

Assim como ocorre nas técnicas baseadas em CRISPR, os métodos clássicos de TALENs, ZFNs e MNs envolvem a introdução de plasmídeos de DNA que expressam essas TALENs, ZFNs ou MNs, sendo introduzidos de forma permanente ou transitória no genoma do organismo-alvo (e posteriormente removidos, se necessário). Também foi demonstrado o uso de RNA mensageiro que codifica a maquinaria TALEN em células vegetais (Stoddard et al., 2016).

Foram ainda demonstrados em laboratório casos excepcionais de uso das técnicas de TALENs e MNs (Luo et al., 2015) nas quais foi realizada a introdução direta das formas proteicas das respectivas nucleases em plantas, gerando um organismo com o genoma editado. Embora estes métodos pudessem ser considerados como não abrangidos pelo critério 2, atualmente são muito menos eficientes do que a inserção de plasmídeos de DNA, e é pouco provável que venham a ser amplamente utilizados.

As técnicas de ODM consistem na introdução direta de oligonucleotídeos, que podem ser de DNA ou híbridos de DNA/RNA, no genoma do organismo-alvo.

Todas as técnicas CRISPR, ZFNs e ODM envolvem o uso de ácidos nucléicos (DNA, RNA ou híbridos de DNA/RNA) para realizar funções de edição do genoma, atendendo assim ao critério 2. A maioria das técnicas de TALENs e MNs, com algumas exceções limitadas, envolve o uso de ácidos nucléicos (DNA ou híbridos de RNA) para realizar funções de edição do genoma, atendendo assim ao critério 2.

Além disso, mesmo que a combinação inédita de material genético obtida através da biotecnologia moderna seja posteriormente transferida para outro organismo pelo uso de técnicas de reprodução ou seleção tradicionais, o organismo resultante também é um OVM nos termos do Protocolo (parágrafo 214, *Explanatory Guide*). Tal definição incluiria, portanto, organismos com genoma editado que introduzem um cassete de DNA que codifica

nucleases e é posteriormente removido por métodos de reprodução convencionais (como é frequentemente realizado com CRISPR, TALENs, ZFNs e MNs), o que atenderia ao critério 2, uma vez que a etapa anterior já teria envolvido a aplicação de técnicas de ácidos nucleicos para gerar uma combinação inédita de material genético.

Assegurar que o processo, e não apenas o resultado, seja regulamentado segundo o critério 2

É fundamental destacar que o critério 2 garante que o processo, e não o resultado, seja regulamentado e avaliado, a fim de permitir a detecção de efeitos não intencionais, alguns dos quais obscurecem a distinção teórica entre as aplicações de ODM, SDN-1, 2 e 3. Já foram detectadas inserções não intencionais de material genético, tanto dentro como fora do alvo molecular (Li et al., 2015; Liang et al., 2017; Ono et al., 2019; Norris et al., 2020; Skryabin et al., 2020), um efeito associado a todas as nucleases que introduzem quebras no DNA de dupla cadeia (incluindo CRISPR, TALENs, ZFNs e MNs). Dessa forma, embora as técnicas de ODM, SDN-1 e SDN-2 não tenham como objetivo a inserção permanente de DNA, as evidências atuais sugerem que, na prática, este resultado pode ocorrer.

Outros efeitos não intencionais já documentados incluem modificações em outras partes do genoma, tais como mutações, rearranjos complexos em grande escala, translocações, inserções e deleções, bem como a produção de novas proteínas (Wolt et al., 2016; Mou et al., 2017; Shin et al., 2017; Zhu et al., 2017; Kosicki et al., 2018; Tuladhar et al., 2019). Até mesmo alterações em um único nucleotídeo podem afetar a função de um gene, sejam elas no alvo molecular ou fora do alvo.

Além disso, o processo de edição do genoma geralmente envolve técnicas de suporte idênticas às utilizadas em métodos de transgênese mais antigos, incluindo a transformação de células criadas em meios de cultura. Tais processos estão associados a efeitos não intencionais, como deleções e rearranjos (veja, por exemplo, Kim et al., 2003; Latham et al., 2006; Makarevitch et al., 2003; Rang et al., 2005; Windels et al., 2003).

Critério 3: as técnicas da biotecnologia moderna utilizadas superam as barreiras naturais da fisiologia da reprodução ou recombinação e não são técnicas utilizadas na reprodução e seleção tradicionais

Está claro que as técnicas de edição do genoma não são técnicas utilizadas na reprodução e seleção tradicionais, pois os organismos com genoma editado são gerados sem nenhum tipo de reprodução, mas sim pelo uso de técnicas da biotecnologia moderna que introduzem alterações genéticas. Também é evidente que elas superam as barreiras naturais da fisiologia da reprodução ou recombinação, uma vez que a edição do genoma permite modificações que não surgiriam naturalmente (veja a revisão por Kawall, 2019). Como detalhado abaixo, as técnicas descritas podem ser usadas para realizar uma ou várias alterações que superam as barreiras naturais de reprodução ou recombinação.

Uma das principais vantagens para aqueles que desenvolvem OVMs é a capacidade de usar a edição do genoma para realizar alterações simultâneas ou sucessivas no material genético, uma aplicação denominada multiplexação. Muitas características vegetais dependem de uma multiplicidade de genes. As técnicas de CRISPR, TALENs, ZFNs e MNs oferecem agora um meio para alterar muitos genes de uma só vez, ou muitas cópias de um mesmo gene (bem como parálogos), o que ainda não foi alcançado com a reprodução convencional, a mutagênese química ou técnicas transgênicas (por exemplo, veja Kawall, 2019; Ran et al., 2018; Wang et al., 2018; Li et al., 2018; Qi et al., 2016; Cai et al., 2018; Bao et al., 2015; Suzuki et al., 2013; Hauschild et al., 2011). A alteração de todas as cópias de um gene é muito relevante no caso das espécies vegetais, pois muitas delas possuem múltiplas cópias de um gene como resultado de poliploidia (a presença de mais de duas cópias de cada cromossomo) ou redundância genética (múltiplas cópias de um mesmo gene). Nem a reprodução convencional nem as mutações naturais são capazes de alterar todas as cópias de uma sequência genética. Embora ainda não tenha sido demonstrada a multiplexação de diferentes genes ou múltiplas cópias de um gene pelo uso da ODM, tais alterações são possíveis em teoria (Jansing et al., 2019).

A edição do genoma permite ainda gerar mutações em regiões do genoma que são normalmente protegidas por mecanismos naturais de reparo do DNA. A variação genética ocorre naturalmente nos organismos como resultado de muitos mecanismos. As mutações podem surgir espontaneamente como resultado de fatores ambientais externos, como a radiação solar ultravioleta ou a exposição a substâncias mutagênicas, ou internos, em razão de erros durante a replicação do DNA ou por subprodutos mutagênicos do metabolismo, tais como as espécies reativas de oxigênio. As mutações decorrentes de tais fatores resultam no recrutamento de mecanismos de reparo que protegem preferencialmente regiões particulares do DNA, como as que contêm genes. Tais mecanismos de reparo servem para evitar o acúmulo excessivo de mutações em regiões do DNA onde as sequências precisam ser conservadas para manter as suas funções essenciais — por exemplo, as sequências que codificam genes. Dessa forma, as técnicas de edição de genoma se sobrepõem aos mecanismos de reparo endógeno, permitindo alterar sequências genéticas normalmente conservadas. Além disso, há evidências de que as mutações resultantes de técnicas de edição do genoma não são reparadas pelos mesmos processos naturais, havendo altas taxas de erros nos reparos de mutações induzidas por CRISPR (Brinkman et al., 2018). Os sistemas CRISPR/Cas têm sido usados para modificar sequências conservadas — por exemplo, quando aplicados às tecnologias de genética dirigida (*gene drive*) (Kyrou et al., 2018). Também foi demonstrado que as TALENs, assim como as ZFNs, são capazes de alterar sequências conservadas (Suzuki et al., 2013; Bilichak et al., 2020).

A variação genética natural também ocorre durante a meiose, a produção de gametas como espermatozoides e óvulos. A meiose, um processo biológico fundamental, é responsável por gerar variação genética nos organismos de reprodução sexuada por recombinar o conteúdo genético recebido de ambos os progenitores. O intercâmbio de material genético entre os cromossomos durante este processo ocorre de maneira não aleatória, em regiões definidas dos cromossomos, denominados pontos críticos (*hotspots*) de recombinação. Por outro lado, a edição do genoma permite alterar o DNA em regiões consideradas 'pontos frios' (*coldspots*), superando estas

limitações naturais. As técnicas de CRISPR/Cas têm sido usadas para superar os efeitos de associação, nos quais os genes desejáveis são ligados a genes indesejáveis em regiões de baixa recombinação (Roldan et al., 2017; Soyk et al., 2017). Além disso, o método CRISPR está sendo explorado para manipular eventos de recombinação meiótica a fim de aumentar a diversidade genética das culturas, embora esta área pareça estar em suas fases iniciais de pesquisa e desenvolvimento (Taagen et al., 2020).

Em resumo, todas as técnicas de edição do genoma permitem superar as barreiras naturais de reprodução e recombinação por uma série de mecanismos, além de não serem técnicas utilizadas nos sistemas de reprodução e seleção tradicionais — e, portanto, atendem ao critério 3.

Agradecimentos

Agradeço à Dra. Sarah Agapito-Tenfen, do Centro de Biossegurança de Genøk, na Noruega, e aos colegas da Rede do Terceiro Mundo pela revisão deste artigo.

Este artigo foi produzido com uma contribuição financeira parcial do SwedBio/Stockholm Resilience Centre.

A **Dra. Eva Sirinathsinghji** tem doutorado em Neurogenética e é pesquisadora em biossegurança, com formação em ciências biomédicas. Trabalha com campanhas da sociedade civil sobre os riscos das tecnologias de engenharia genética, incluindo as novas tecnologias da área.

Referências

Bao Z, Xiao H, Liang J, Zhang L, Xiong X, Sun N, Si T, Zhao H (2015). Homology-integrated CRISPR-Cas (HI-CRISPR) system for one-step multigene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synth. Biol.* 4(5): 585-594. doi: 10.1021/sb500255k. Epub 2014 Sep 19. PMID: 25207793.

Bilichak A, Sastry-Dent L, Sriram S, Simpson M, Samuel P, Webb S, Jiang F, Eudes F (2020). Genome editing in wheat microspores and haploid embryos mediated by delivery of

ZFN proteins and cell-penetrating peptide complexes. *Plant Biotechnol. J.* 18(5): 1307-1316. doi: 10.1111/pbi.13296. Epub 2019 Dec 3. PMID: 31729822; PMCID: PMC7152605.

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: 801-813.e806. doi: 10.1016/j.molcel.2018.04.016

Cai Y, Chen L, Liu X, Guo C, Sun S, Wu C, Jiang B, Han T, Hou W (2018). CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of GmFT2a delays flowering time in soya bean. *Plant Biotechnol. J.* 16(1): 176-185. doi: 10.1111/pbi.12758

Hauschild J, Petersen B, Santiago Y, Queisser AL, Carnwath JW, Lucas-Hahn A, Zhang L, Meng X, Gregory PD, Schwinzer R, Cost GJ, Niemann H (2011). Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108(29): 12013-12017. doi: 10.1073/pnas.1106422108. Epub 2011 Jul 5.

Jansing J, Schiermeyer A, Schillberg S, Fischer R, Bortesi L (2019). Genome Editing in Agriculture: Technical and Practical Considerations. *Int. J. Mol. Sci.* 20(12): 2888. doi: 10.3390/ijms20122888. PMID: 31200517; PMCID: PMC6627516.

Kawall K (2019). New Possibilities on the Horizon: Genome Editing Makes the Whole Genome Accessible for Changes. *Front. Plant Sci.* 10: 525. doi: 10.3389/fpls.2019.00525. PMID: 31068963; PMCID: PMC6491833.

Kim S-R, Lee J, Jun S-H, Park S, Kang H-G, Kwon S, An G (2003). Transgene structures in T-DNA-inserted rice plants. *Plant Mol. Biol.* 52: 761-773. doi: 10.1023/a:1025093101021

Kosicki M, Tomberg K, Bradley A (2018). Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nat. Biotechnol.* 36: 765-771.

Kyrou K, Hammond AM, Galizi R, Kranjc N, Burt A, Beaghton AK, Nolan T, Crisanti A (2018). A CRISPR-Cas9 gene drive targeting doublesex causes complete population suppression in caged *Anopheles gambiae*

- mosquitoes. *Nat. Biotechnol.* 36(11): 1062-1066. doi: 10.1038/nbt.4245
- Latham JR, Wilson AK, Steinbrecher RA (2006). The mutational consequences of plant transformation. *J. Biomed. Biotechnol.* 25376. doi: 10.1155/JBB/2006/25376
- Li R, Li R, Li X, Fu D, Zhu B, Tian H, Luo Y, Zhu H (2018). Multiplexed CRISPR/Cas9-mediated metabolic engineering of γ -aminobutyric acid levels in *Solanum lycopersicum*. *Plant Biotechnol. J.* 16(2): 415-427. doi: 10.1111/pbi.12781. Epub 2017 Aug 2. PMID: 28640983; PMCID: PMC5787826.
- Li Z, Liu ZB, Xing A, Moon BP, Koellhoffer JP, Huang L, Ward RT, Clifton E, Falco SC, Cigan AM (2015). Cas9-guide RNA directed genome editing in soybean. *Plant Physiol.* 169(2): 960-970. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00783>
- Liang Z, Chen K, Li T, Zhang Y, Wang Y, Zhao Q, Liu J, Zhang H, Liu C, Ran Y, Gao C (2017). Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat. Commun.* 8: 14261.
- Luo S, Li J, Stoddard TJ, Baltus NJ, Demorest ZL, Clasen BM, Coffman A, Retterath A, Mathis L, Voytas DF, Zhang F (2015). Non-transgenic Plant Genome Editing Using Purified Sequence-Specific Nucleases. *Mol. Plant* 8(9): 1425-1427. doi: 10.1016/j.molp.2015.05.012
- Mackenzie R, Burhenne-Guilmin F, La Viña AGM, Werksman JD in cooperation with Ascencio A, Kinderlerer J, Kumme K, Tapper R (2003). *An Explanatory Guide to the Cartagena Protocol on Biosafety*. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. xvi + 295pp.
- Makarevitch I, Svitashv SK, Somers DA (2003). Complete sequence analysis of transgene loci from plants transformed via microprojectile bombardment. *Plant Mol. Biol.* 52: 421-432. doi: 10.1023/a:1023968920830
- Metje-Sprink J, Menz J, Modrzejewski D, Sprink T (2019). DNA-Free Genome Editing: Past, Present and Future. *Front Plant Sci.* 14(9): 1957. doi: 10.3389/fpls.2018.01957. PMID: 30693009; PMCID: PMC6339908.
- Mou H, Smith JL, Peng L, Yin H, Moore J, Zhang XO, Song CQ, Sheel A, Wu Q, Ozata DM, Li Y, Anderson DG, Emerson CP, Sontheimer EJ, Moore MJ, Weng Z, Xue W (2017). CRISPR/Cas9-mediated genome editing induces exon skipping by alternative splicing or exon deletion. *Genome Biol.* 18(1): 108.
- Norris AL, Lee SS, Greenlees KJ, Tadesse DA, Miller MF, Lombardi HA (2020). Template plasmid integration in germline genome-edited cattle. *Nat. Biotechnol.* 38(2): 163-164. doi: 10.1038/s41587-019-0394-6
- Ono R, Yashuhiko Y, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J, Hirabayashi Y (2019). Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing. *Communications Biology* 2: 57.
- Qi W, Zhu T, Tian Z, Li C, Zhang W, Song R (2016). High-efficiency CRISPR/Cas9 multiplex gene editing using the glycine tRNA-processing system-based strategy in maize. *BMC Biotechnol.* Aug 11; 16(1): 58. doi: 10.1186/s12896-016-0289-2. PMID: 27515683; PMCID: PMC4982333.
- Ran Y, Patron N, Kay P, Wong D, Buchanan M, Cao YY, Sawbridge T, Davies JP, Mason J, Webb SR, Spangenberg G, Ainley WM, Walsh TA, Hayden MJ (2018). Zinc finger nuclease-mediated precision genome editing of an endogenous gene in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) using a DNA repair template. *Plant Biotechnol. J.* 16(12): 2088-2101.
- Rang A, Linke B, Jansen B (2005). Detection of RNA variants transcribed from the transgene in Roundup Ready soybean. *Eur. Food Res. Technol.* 220: 438-443. doi:10.1007/s00217-004-1064-5
- Roldan MVG, Périlleux 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
- Shin HY, Wang C, Lee HK, Yoo KH, Zeng X, Kuhns T, Yang CM, Mohr T, Liu C, Hennighausen L (2017). CRISPR/Cas9 targeting events cause complex deletions and insertions

- at 17 sites in the mouse genome. *Nat. Commun.* 8: 15464.
- Skryabin BV, Kummerfeld DM, Gubar L, Seeger B, Kaiser H, Stegemann A, Roth J et al. (2020). Pervasive head-to-tail insertions of DNA templates mask desired CRISPR-Cas9-mediated genome editing events. *Sci. Adv.* 6(7): eaax2941.
- Soyk S, Lemmon ZH, Oved M, Fisher J, Liberatore KL, Park SJ, Goren A, Jiang K, Ramos A, van der Knaap E, Van Eck J, Zamir D, Eshed Y, Lippman ZB (2017). Bypassing Negative Epistasis on Yield in Tomato Imposed by a Domestication Gene. *Cell* 169(6): 1142-1155. e12. doi: 10.1016/j.cell.2017.04.032
- Stoddard TJ, Clasen BM, Baltes NJ, Demorest ZL, Voytas DF, Zhang F et al. (2016). Targeted mutagenesis in plant cells through transformation of sequence-specific nuclease mRNA. *PLoS One* 11: e0154634. doi: 10.1371/journal.pone.0154634
- Suzuki KT, Isoyama Y, Kashiwagi K, Sakuma T, Ochiai H, Sakamoto N, Furuno N, Kashiwagi A, Yamamoto T (2013). High efficiency TALENs enable F0 functional analysis by targeted gene disruption in *Xenopus laevis* embryos. *Biol. Open.* 2(5): 448-452. doi: 10.1242/bio.20133855. PMID: 23789092; PMCID: PMC3654262.
- 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
- Tuladhar R, Yeu Y, Tyler Piazza J, Tan Z, Clemenceau JR, Wu X, Barrett Q, Herbert J, Mathews DH, Kim J, Hwang TH, Lum L (2019). CRISPR-Cas9-based mutagenesis frequently provokes on-target mRNA misregulation. *Nat. Commun.* 10: 4056. doi: 10.1038/s41467-019-12028-5
- Wang W, Pan Q, He F, Akhunova A, Chao S, Trick H, Akhunov E (2018). Transgenerational CRISPR-Cas9 Activity Facilitates Multiplex Gene Editing in Allopolyploid Wheat. *CRISPR J.* 1(1): 65-74. doi: 10.1089/crispr.2017.0010. PMID: 30627700; PMCID: PMC6319321.
- Windels P, De Buck S, Van Bockstaele E, De Loose M, Depicker A (2003). T-DNA integration in Arabidopsis chromosomes. Presence and origin of filler DNA sequences. *Plant Physiol.* 133: 2061-2068. doi: 10.1104/pp.103.027532
- Wolt JD, Wang K, Sashital D, Lawrence-Dill CJ (2016). Achieving Plant CRISPR Targeting that Limits Off-Target Effects. *Plant Genome* 9(3). doi: 10.3835/plantgenome2016.05.0047
- Zhu C, Bortesi L, Baysal C, Twyman RM, Fischer R, Capell T, Schillberg S, Christou P (2017). Characteristics of Genome Editing Mutations in Cereal Crops. *Trends Plant Sci.* 22(1): 38-52. doi: 10.1016/j.tplants.2016.08.009