

# Informe sobre Bioseguridad



Diciembre 2020

## Porqué los organismos con genomas editados no están excluidos del Protocolo de Cartagena sobre Bioseguridad

Por **Eva Sirinathsinghi**

Nuevas técnicas de edición de genomas emergen y son promovidas como métodos rápidos de ingeniería genética para cambiar la información genética y su expresión en regiones seleccionadas del genoma. Tales técnicas incluyen repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR, por su sigla en inglés), meganucleasas (MN), nucleasas con dedos de zinc (ZFN), nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN) y mutagénesis dirigida por oligonucleótidos (ODM). El desarrollo de esas técnicas ha suscitado intensos debates sobre: 1) si están reguladas por la legislación vigente en materia de seguridad de la biotecnología, 2) si son seguras, y 3) si deben someterse a los mismos procedimientos de evaluación y gestión de riesgos que los organismos vivos modificados (OVM).

Un argumento promovido por los que tratan de excluir de la reglamentación, incluso a nivel nacional, a los organismos con genoma editado es que los organismos manipulados con técnicas de edición del genoma no están comprendidos en la definición de OVM que figura en el Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB).

Este documento se propone mostrar que las tecnologías y aplicaciones de edición de genomas actualmente desplegadas, incluidas todas las técnicas que utilizan sistemas basados en el CRISPR, entran claramente en la definición de OVM del Protocolo, ya sea que impliquen la inserción, supresión o edición de secuencias de genomas.

**TWN** LA RED DEL TERCER MUNDO (THIRD WORLD NETWORK, TWN) es una organización internacional independiente de investigación y cabildeo, sin ánimo de lucro, que se dedica a lograr una mejor expresión de las necesidades, aspiraciones y derechos de los pueblos del Sur y a promover un desarrollo justo, equitativo y ecológico.

**Dirección:** 131 Jalan Macalister, 10400 Penang, MALASIA **Tel:** 60-4-2266728/2266159 **Fax:** 60-4-2264505

**Email:** [twn@twnetwork.org](mailto:twn@twnetwork.org) **Sitio web:** [www.twn.my](http://www.twn.my)



GENEWATCH UK es una agrupación sin fines de lucro y de interés público que investiga políticas, en particular cómo la ciencia y tecnología genéticas impactarán sobre nuestros alimentos, salud, agricultura, ambiente y sociedad.

**Dirección:** 53 Milton Rd, Cambridge CB4 1XA, UK **Tel:** +44 (0)330 0010507 **Email:** [mail@genewatch.org](mailto:mail@genewatch.org)

**Sitio web:** [www.genewatch.org](http://www.genewatch.org)

*El contenido de esta publicación puede ser republicado o reutilizado gratuitamente para fines no comerciales, salvo que se indique lo contrario. Esta publicación se distribuye bajo una licencia internacional Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0.*

## La definición de «organismo vivo modificado» en el Protocolo de Cartagena

El artículo 3 del Protocolo de Cartagena ofrece tres definiciones que están interrelacionadas y deben leerse conjuntamente: «organismo vivo modificado», «organismo vivo» y «biotecnología moderna».

Por «organismo vivo modificado» se entiende «todo organismo vivo que posea una combinación nueva de material genético obtenida mediante la aplicación de la biotecnología moderna».

Así, un organismo vivo modificado se define en el Protocolo para incluir sólo aquellos organismos vivos que

- contienen combinaciones novedosas de material genético; y
- se han producido utilizando las técnicas de la biotecnología moderna (párrafo 208, *An Explanatory Guide to the Cartagena Protocol on Biosafety (Guía explicativa del Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología)*: Mackenzie y otros, 2003).

Por «organismo vivo» se entiende «toda entidad biológica capaz de transferir o replicar material genético, incluidos los organismos estériles, los virus y los viroides».

Si bien el Protocolo de Cartagena no define el «material genético», el Convenio sobre la Diversidad Biológica sí lo hace: «todo material de origen vegetal, animal, microbiano o de otro tipo que contenga unidades funcionales de la herencia». Se entiende por unidades funcionales de la herencia los ácidos nucleicos que contienen información genética. En el contexto del Protocolo de Cartagena, se puede entender que el material genético se refiere a los ácidos nucleicos que contienen unidades funcionales de la herencia (párrafo 201, *Guía explicativa*).

Una «combinación nueva de material genético» puede considerarse como una combinación cuya existencia no se conocía previamente en el momento en que se produjo por primera vez. Vinculado a la definición de material genético del Convenio sobre la Diversidad Biológica, puede entenderse que se refiere a una combinación nueva de ácidos nucleicos que contiene unidades funcionales de la

herencia (párrafo 209 de la *Guía explicativa*). Es importante señalar que la combinación nueva se refiere únicamente a una combinación de material genético, incluso si esto no da lugar a un cambio observable (párrafo 210 de la *Guía explicativa*).

La novedad de una combinación podría surgir a través de una forma nueva de una unidad funcional de la herencia, por ejemplo, resultante de un cambio que modifique la secuencia global de nucleótidos dentro de la unidad, ya sea alterando, insertando o eliminando uno o más nucleótidos. La novedad también podría surgir de una nueva disposición de las unidades funcionales de la herencia, por ejemplo, la introducción de material genético de diferentes especies o la reorganización del material genético de la misma especie. Una combinación novedosa podría surgir de un único cambio en una secuencia de nucleótidos o de cambios mucho mayores (párrafos 211-212, *Guía explicativa*).

Según el Protocolo de Cartagena, la combinación novedosa de material genético debe «obtenerse mediante el uso de la biotecnología moderna». Este es un criterio fundamental para la definición de un OVM. El hecho de que un organismo sea o no un OVM en virtud del Protocolo depende de si se utiliza la «biotecnología moderna» para crear una combinación nueva de material genético.

La «biotecnología moderna» se define en el Protocolo de Cartagena como: «La aplicación de:

- a. Técnicas in vitro de ácido nucleico, incluido el ADN recombinante y la inyección directa de ácido nucleico en células u orgánulos, o
  - b. Fusión de células más allá de la familia taxonómica,
- que superan las barreras fisiológicas naturales de reproducción o recombinación y que no son técnicas utilizadas en la reproducción y selección tradicional».

Por lo tanto, esto incluye, entre otras, las técnicas de ácido nucleico in vitro aplicadas a la inserción, supresión y alteración del material genético (párrafo 215 de la *Guía explicativa*). Los dos requisitos son que deben superarse las barreras fisiológicas naturales de reproducción o recombinación y que no

son técnicas utilizadas en la reproducción y selección tradicionales.

En resumen, para que un organismo vivo se defina como OVM con arreglo al Protocolo de Cartagena, tiene que cumplir tres criterios:

1. El organismo contiene combinaciones nuevas de material genético;
2. Ha sido producido utilizando las técnicas de la biotecnología moderna (incluida la aplicación de técnicas *in vitro* de ácido nucleico o la fusión de células más allá de la familia taxonómica); y
3. Las técnicas biotecnológicas modernas utilizadas han superado las barreras fisiológicas naturales de reproducción o recombinación y no son técnicas utilizadas en la reproducción y selección tradicional.

### **Criterio 1: el organismo contiene nuevas combinaciones de material genético**

Para los sistemas basados en el CRISPR, la técnica implica el uso de secuencias de ARN guía (ARNg) que se producen sintéticamente para dirigirse a una secuencia de ADN (o ARN) de interés para la "edición". El ARNg dirige entonces la enzima cortadora de ADN Cas9, o endonucleasa, hacia la secuencia de interés, donde luego corta el ADN. Una vez que se corta el ADN, se activa la maquinaria de reparación del ADN de la célula y se repara el ADN. Si el proceso de reparación resulta en la inserción o eliminación de pequeños trozos de material genético ("indels"), el resultado se denomina aplicación de la nucleasa dirigida por el sitio (SDN-1). Las aplicaciones de ARN-1 se utilizan para destruir genes de forma imprecisa. Alternativamente, si la intención es "editar" un gen, también se introduce ADN adicional que proporciona la plantilla para la alteración deseada que luego puede ser copiada en el gen del organismo objetivo. Esto se denomina ARN-2. Los sistemas basados en CRISPR también se utilizan para insertar ADN transgénico en un sitio objetivo, mediante la introducción de una plantilla de ADN junto a la maquinaria de CRISPR. Esto se denomina ARN-3.

De manera similar, los TALENs, MNs y ZFNs pueden ser diseñados para realizar aplicaciones ARN-1, -2 y -3 de "indels", ediciones o inserciones de secuencias de ADN

transgénico. Sin embargo, se diferencian de los sistemas basados en CRISPR en que no despliegan ARNg para atacar secuencias específicas de ADN, sino que son enzimas basadas en proteínas que tienen sitios de reconocimiento de ADN para unir y dividir secuencias particulares de ADN de interés.

El ODM, por otra parte, implica la introducción de cortos tramos de ADN, llamados oligonucleótidos, o híbridos de oligonucleótidos de ADN/ARN. Estos oligonucleótidos son idénticos a la secuencia objetivo que se va a modificar, excepto por la alteración que se desea introducir. Estas plantillas de ADN se unen a la secuencia diana, tras lo cual la maquinaria de reparación natural de la célula reconoce el desajuste de base única entre su propio ADN y el de la plantilla de reparación.

El propósito de todas las técnicas de edición del genoma es introducir cambios genéticos previamente inexistentes con el fin de generar nuevos rasgos en los organismos vivos, independientemente de si se ha insertado o no el ADN. Ya sea que se utilicen para generar "indels", "ediciones" o "inserciones", todas apuntan a generar nuevos rasgos mediante la generación de nuevas combinaciones de ADN, independientemente de si el ADN transgénico está efectivamente insertado.

*Así pues, es evidente que **todas** las técnicas de edición del genoma producen una combinación novedosa de material genético y, por lo tanto, cumplen el criterio 1.*

### **Criterio 2: el uso de la biotecnología moderna (incluyendo la aplicación de técnicas de ácido nucleico *in vitro*, o la fusión de células más allá de la familia taxonómica)**

En la actualidad, la gran mayoría de las técnicas de edición del genoma requieren la aplicación de técnicas de ácido nucleico, que implican el uso de ARN o de ácidos nucleicos de ADN en una determinada etapa del proceso.

Las técnicas basadas en el CRISPR (incluidas las dobles nicadas y los «editores» de base) pueden realizarse de varias maneras, todas las cuales implican la introducción de ácidos nucleicos de ADN o ARN. El enfoque clásico

es introducir plásmidos de ADN que codifican para la maquinaria del CRISPR. O bien el plásmido se introduce de forma permanente en el genoma del organismo objetivo, y posteriormente puede ser eliminado por retrocruzamiento, o puede ser expresado de forma transitoria. Más recientemente, se han desarrollado técnicas sin ADN, que utilizan la introducción de moléculas mensajeras de ARN que codifican para la maquinaria del CRISPR, o la introducción directa de ribonucleoproteínas que consisten en la proteína Cas9 junto con la molécula de ARN guía (Metje-Sprink et al., 2019).

Al igual que con las técnicas basadas en el CRISPR, los métodos clásicos de TALEN, ZFN y MN implican la introducción de plásmidos de ADN que expresan cada uno de los TALEN, ZFN o MN respectivamente, ya sea introducidos de forma permanente en el genoma del organismo objetivo (y posteriormente eliminados si se desea), o de forma transitoria. También se ha demostrado la codificación del ARN mensajero para la maquinaria de los TALEN en las células de las plantas (Stoddard et al., 2016).

Se han demostrado excepciones limitadas en el laboratorio usando TALENs y MNs (Luo et al., 2015) donde la entrega directa de las formas proteicas respectivas de las nucleasas se ha realizado en plantas para generar un organismo editado por el genoma. Si bien podría decirse que esto quedaría fuera del cumplimiento del criterio 2, esos métodos son actualmente mucho menos eficientes que la entrega de plásmidos de ADN y es poco probable que se utilicen ampliamente.

Las técnicas de ODM se realizan introduciendo directamente los oligonucleótidos, que pueden ser en forma de ADN, o híbridos de ADN/ARN, en el genoma del organismo objetivo.

*Todas las técnicas basadas en CRISPR, ZFN y ODM requieren el uso de ácidos nucleicos (ya sea ADN, ARN o híbridos de ADN / ARN) para realizar funciones de edición del genoma y, por lo tanto, cumplen el criterio 2. La mayoría de las técnicas de TALEN y MN, con algunas excepciones limitadas, implican el uso de ácidos nucleicos (ya sea ADN o híbridos de ARN) para realizar funciones de edición del genoma y, por lo tanto, cumplen el criterio 2.*

Además, incluso si la nueva combinación de material genético obtenido mediante biotecnología moderna se transfiere posteriormente a otro organismo mediante técnicas tradicionales de reproducción o selección, el organismo resultante también es un OVM según el Protocolo (párrafo 214, *Guía explicativa*). Por lo tanto, dicha definición incluiría organismos editados en el genoma que introducen un casete de ADN que codifica nucleasas que luego se elimina mediante el mejoramiento convencional (como a menudo se realiza con CRISPR, TALEN, ZFN y MN). Esto cumple el criterio 2, ya que el paso anterior ya implicaba la aplicación de técnicas de ácidos nucleicos para generar una combinación novedosa de material genético.

### **Asegurar que el proceso y no solo el resultado esté regulado por el criterio 2**

Es vital resaltar que el criterio 2 asegura que el proceso, no el resultado, sea regulado y evaluado, con el fin de permitir la detección de efectos no intencionales, algunos de los cuales socavan la distinción teórica entre aplicaciones de ODM, SDN-1, -2 y -3. Se han detectado inserciones no intencionales de material genético, en sitios tanto dentro como fuera del objetivo (Li et al., 2015; Liang et al., 2017; Ono et al., 2019; Norris et al., 2020; Skryabin et al., 2020), un efecto asociado con todas las nucleasas que introducen roturas de ADN de doble hebra (incluidos CRISPR, TALEN, ZFN y MN). Como tal, si bien la intención de ODM, SDN-1 o -2 no implica la inserción permanente de ADN, la evidencia actual sugiere que a menudo este resultado es más teórico que práctico.

Otros efectos no intencionales documentados incluyen modificaciones fuera del objetivo en otras partes del genoma, por ejemplo, mutaciones, reordenamientos complejos a gran escala, translocaciones, inserciones y eliminaciones, así como producción de proteínas nuevas (Wolt et al., 2016; Mou et al., 2017; Shin et al., 2017; Zhu et al., 2017; Kosicki et al., 2018; Tuladhar et al., 2019). Incluso las alteraciones de un solo nucleótido pueden tener impactos en la función de un gen, ya sea en la ubicación objetivo o fuera de ella.

Además, el proceso de edición del genoma generalmente implica técnicas de apoyo idénticas a las técnicas de transgénesis más antiguas, incluida la transformación de células cultivadas en cultivo. Estos procesos están asociados con efectos no deseados como eliminaciones y reordenamientos (ver, por ejemplo, Kim et al., 2003; Latham et al., 2006; Makarevitch et al., 2003; Rang et al., 2005; Windels et al., 2003).

### **Criterio 3: las técnicas biotecnológicas modernas utilizadas han superado las barreras fisiológicas naturales de reproducción o recombinación y no son técnicas utilizadas en la cría y selección tradicionales**

Está claro que las técnicas de edición del genoma no son técnicas utilizadas en la cría y selección tradicionales, ya que los organismos editados del genoma se generan sin que se produzca ninguna cría, sino mediante el uso de técnicas biotecnológicas modernas para introducir cambios genéticos. También es evidente que eluden las barreras naturales de reproducción o recombinación, y la edición del genoma permite modificaciones que de otro modo no surgirían de forma natural (ver revisión de Kawall, 2019). Como se detalla a continuación, las técnicas descritas se pueden usar para realizar una o múltiples modificaciones que superen las barreras naturales de reproducción o recombinación.

Una de las principales ventajas otorgadas a los desarrolladores de OVM es la capacidad de utilizar la edición del genoma para realizar alteraciones simultáneas o sucesivas del material genético, una aplicación denominada multiplexación. Muchos rasgos de las plantas dependen de una multitud de genes. Las técnicas CRISPR, TALENs, ZFNs y MNs ahora ofrecen un medio para apuntar a muchos genes a la vez, o múltiples copias del mismo gen (así como parálogos), algo que aún no se ha logrado hasta hoy con la reproducción convencional, mutagénesis química o técnicas transgénicas (por ejemplo, ver 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). La alteración de todas las copias de

un gen es muy relevante para las plantas, y muchas especies tienen múltiples copias de un gen como resultado de la poliploidía (tener más de dos copias de cada cromosoma) o la redundancia genética (tener múltiples copias de un gen). Ni la crianza convencional ni las mutaciones naturales pueden alterar todas las copias de una secuencia genética. Si bien el ODM no ha logrado aún la multiplexación de diferentes genes o copias múltiples de genes, en teoría, tales alteraciones son posibles (Jansing et al., 2019).

La edición del genoma permite además la generación de mutaciones en regiones del genoma que normalmente están protegidas por mecanismos de reparación del ADN que existen de forma natural. La variación genética ocurre naturalmente en los organismos como resultado de numerosos mecanismos. Las mutaciones pueden surgir espontáneamente como resultado de factores ambientales externos, por ejemplo, luz solar ultravioleta o exposición a sustancias mutagénicas, o internamente como resultado de errores durante la replicación del ADN o por subproductos metabólicos mutagénicos, por ejemplo, especies reactivas de oxígeno. Las mutaciones que surgen de tales factores dan como resultado el reclutamiento de mecanismos de reparación del ADN, con protección preferencial de regiones particulares del ADN, como las que contienen genes. Por tanto, los mecanismos de reparación del ADN funcionan para prevenir la acumulación excesiva de mutaciones en las regiones del ADN donde las secuencias necesitan conservarse para mantener sus funciones clave, por ejemplo, secuencias que codifican genes. Las técnicas de edición del genoma anulan los mecanismos de reparación endógenos con la capacidad de alterar las secuencias genéticas conservadas. Además, la evidencia sugiere que las mutaciones resultantes de las técnicas de edición del genoma no se reparan con los mismos procesos que los que se han producido de forma natural, con altas tasas de error en las reparaciones de mutaciones inducidas por CRISPR (Brinkman et al., 2018). Los sistemas CRISPR / Cas se han utilizado para modificar secuencias conservadas, por ejemplo, cuando se aplican a tecnologías de impulso genético (Kyrou et al., 2018). También se ha demostrado que las TALEN, así como las ZFN, se dirigen a secuencias conservadas (Suzuki et al., 2013; Bilichak et al., 2020).

La variación genética natural también se genera durante la meiosis, la producción de gametos como los espermatozoides y los óvulos. La meiosis, un proceso biológico fundamental, es responsable de generar variación genética en los organismos que se reproducen sexualmente mediante la recombinación del contenido genético recibido de ambos padres. El intercambio de material genético entre cromosomas durante este proceso se produce de manera no aleatoria, en regiones definidas de los cromosomas, a veces denominadas «puntos calientes» de recombinación. Por el contrario, la edición del genoma permite alterar el ADN en regiones que se denominan «puntos fríos», anulando estas limitaciones naturales. CRISPR / Cas se ha utilizado para superar los efectos de arrastre de ligamiento donde los genes deseables están ligados a genes indeseables en regiones de baja recombinación (Roldan et al., 2017; Soyk et al., 2017). Además, se está explorando CRISPR para la manipulación de eventos de recombinación meiótica con el fin de aumentar la diversidad genética de los cultivos, aunque esto parece estar en las primeras etapas de investigación y desarrollo (Taagen et al., 2020).

*En resumen, todas las técnicas de edición del genoma permiten eludir las barreras naturales de reproducción y recombinación a través de multitud de mecanismos, además de no ser técnicas utilizadas en la cría y selección tradicionales, y por lo tanto cumplen el criterio 3.*

---

## Reconocimientos

Agradezco a la Dra. Sarah Agapito-Tenfen de GenØk – Centro de Bioseguridad, Noruega y colegas de la Red del Tercer Mundo por revisar este documento.

Este informe se produjo con una contribución financiera parcial de SwedBio / Stockholm Resilience Center.

---

---

La **Dra. Eva Sirinathsinghji** tiene un Ph.D. en Neurogenética y es investigadora en bioseguridad con experiencia en ciencias biomédicas. Trabaja con campañas de la sociedad civil sobre los riesgos de las tecnologías de ingeniería genética, incluidas las nuevas tecnologías de ingeniería genética.

---

## Referencias

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  $\gamma$ -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, Baltes 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, Baltus 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