

Til Landbrugsstyrelsen

—

Levering på bestillingen "AU's kommentering af rapport fra Friends of the Earth om geneditering"

Landbrugsstyrelsen har i bestilling sendt d. 19. september 2018 bedt DCA – Nationalt Center for Fødevarer og Jordbrug – om at kommentere på rapporten "Gene-edited organisms in agriculture – Risks and unexpected consequences" fra Friends of the Earth.

—

Besvarelsen er todelt: del 1 - Genredigering og planteforædling og del 2 - Genredigering og miljø. Del 1 er udarbejdet af seniorforsker Per Gregersen, lektor Kim Hebelstrup, forsker Inger Holme og professor Henrik Brinch-Pedersen fra Institut for Molekylærbiologi og Genetik ved Aarhus Universitet og fagfællebedømt af seniorforsker Birte Boelt fra Institut for Agroøkologi ved Aarhus Universitet. Del 2 er udarbejdet af seniorforsker Paul Henning Krogh, professor Christian Damgaard og seniorforsker Christian Kjær fra Institut for Bioscience ved Aarhus Universitet og fagfællebedømt af seniorrådgiver Morten Tune Strandberg fra samme institut.

Besvarelsen er udarbejdet som led i "Rammeaftale om forskningsbaseret myndighedsbetjening mellem Miljø- og Fødevareministeriet og Aarhus Universitet" under ID 1.21 i "Ydelsesaftale Planteproduktion 2018-2021".

—

Venlig hilsen

Lene Hegelund

DCA - Nationalt Center for
Fødevarer og Jordbrug

Lene Hegelund
Specialkonsulent

Dato 21. december 2018

—

Direkte tlf.: 8715 7441
Mobiltlf.: 9350 8931
E-mail:
lene.hegelund@dca.au.dk

Afs. CVR-nr.: 31119103
Journal 2018-760-000896



Kommentarer til rapporten:

”Gene-edited organisms in agriculture: Risks and unexpected consequences”

Kommentarerne til rapporten er udarbejdet af:

DEL I: Per Gregersen¹, Kim Hebelstrup¹, Inger Holme¹ og Henrik Brinch-Pedersen¹

DEL II: Paul Henning Krogh, Christian Damgaard² og Christian Kjær²

¹Aarhus Universitet, Institut for Molekylær Biologi og Genetik, Forsøgsvej 1, 4200 Slagelse

²Aarhus Universitet, Institut for Bioscience - Plante- og Insektøkologi, Vejløvej 25, 8600 Silkeborg

Bestillingen fra LBST:

AU bedes kommentere og vurdere rapporten ”Gene-edited organisms in agriculture: Risk and unexpected consequences”, herunder især påstandene om:

- *at der er en række utilsigtede effekter og dermed risici ved de nye målrettede mutageneseteknikker,*
- *at der er utilstrækkelig viden og forskning om disse effekter.*

Fokus bør ligge på anvendelsen af de nye teknikker til forædling af planter, men relevante eksempler fra andre organismer kan selvfølgelig indgå. Sammenligninger med effekter og risici ved konventionelle forædlingsmetoder og mutageneseteknikker kan også indgå.

Rapporten "Gene-edited organisms in agriculture: Risks and unexpected consequences" er udarbejdet af Dr. Janet Cotter, Logos Environmental, UK og Dana Perls, M.C.P., Senior Food and Technology Campaigner, Friends of the Earth U.S. Rapporten er udgivet af Friends of the Earth (FoE) og sigter først og fremmest imod situationen i USA. Vi har følgende kommentarer til rapporten:

DEL I: Genredigering og planteforædling

Ubalanceret fokus på herbicidresistens som egenskab

Herbicidtolerance fremhæves i rapporten som den væsentligste egenskab, der kan udvikles med genredigering. Det er her vigtigt at fremhæve, at de fleste af de egenskaber, som på nuværende tidspunkt er udviklet ved genredigering, og som er registreret, er rettet mod andre egenskaber, og at herbicidresistens kun udgør en meget lille del.

Der optræder endvidere konkrete fejl i omtalen af herbicidresistens og CRISPR. I Executive Summary (s3) skrives: " *This prevalence (red: for herbicide resistance) implies that, like current genetically engineered crops, the application of techniques like CRISPR will further entrench a chemical intensive approach to agriculture. In fact, the first product to go to market was Cibus' SU CanolaTM, which is resistant to the herbicide sulfonyleurea*". Cibus SU Canola ikke er udviklet ved CRISPR, men ved en helt anden teknik ved navn "oligo directed mutagenesis (ODM)". Se endvidere:

http://nabc.cals.cornell.edu/Publications/Reports/nabc_26/26_2_3_Gocal.pdf

Herbicidresistens kan desuden udvikles på mange andre måder end ved brug af genredigering eller ved andre metoder end de, som i dag reguleres som GMO i USA. Herbicidresistens/tolerance kan tænkes udviklet ved brug af traditionel mutationsforædling og forædling.

Rapporten udelader at diskutere potentiale for brug af genredigering til at forbedre afgrøders sundhedsfremme, tilpasning til klimaforandringer og reduktion i brug af pesticider. Som omtalt i rapporten 'Vidensyntese om nye planteforædlingsteknikker og deres effekt på dansk landbrug' summeres en række forskellige af sådanne potentialer (Brinch-Pedersen et al., 2018). I rapporten diskuteres muligheden for at bruge særligt afgrænsede typer af genredigering (såkaldt SDN1) til præcisionsforædling. Ved præcisionsforædling bruges genredigering af SDN1-typen som ved traditionel mutationsforædling til at øge hyppigheden af naturligt forekommende mutationer, blot med en præcision, hvor få i stedet for mange tusinder mutationer induceres. Fra sådanne eksempler i vidensyntesen kan bl.a. fremhæves:

- Udvikling af hvede med et væsentligt reduceret indhold af sygdomsrelateret gluten, med potentiale for på sigt at forædle hvede, der er helt fri for den sygdomsrelaterede gluten.
- Udvikling af afgrøder med naturligt resistens mod sygdomme, som derved nedsætter behov for brug af pesticider.
- Brug af præcisionsforædling til at forædle nye klimatilpassede sorter med forbedret tørke- eller oversvømmelsestolerance.
- Udvikling af sorter med sundhedsfremmende egenskaber, herunder til behandling og forebyggelse af livsstilssygdomme

Forskellige systemer sammenblandes

Mange af de eksempler, som rapporten giver på uønskede mutationer og effekter efter anvendelse af genom-redigering, er fra andre systemer end planter. Fremstillingen fremstår således uafbalanceret og ude af kontekst, selvom der refereres til videnskabelige referencer, i forhold til at vurdere anvendelsen inden for forskellige felter. Der er stor forskel på at skulle anvende teknologien i en genterapisammenhæng, hvor der er tale om en unik patient, og i planteforædlingen, hvor der er stor erfaring med og metoder til at selektere de ønskede egenskaber i nye sorter. Det er en integreret del af planteforædlingen, at karakterisere og selektere kraftigt i forædlingsmateriale, og det vil man også gøre med de nye teknologier. Frasortering af uegnet materiale er derfor helt naturligt i den sammenhæng, mens dette stiller sig helt anderledes ved fx gen-terapi, hvor forekomst af fejl i sagens natur skal være minimal.

De såkaldte "gene drives" udgør en væsentlig del af rapportens kritik, men dette område, hvor gen-defekter spredte sig i populationer af fx myg, adskiller sig også væsentligt fra anvendelsen af genredigering i planteforædlingen, fordi risici i f.eks. en population af myg kan have en helt anden fatal konsekvens for økosystemer. Gene drivers har dog ikke noget specielt med genredigeringsmetoderne at gøre, de kan også fremstilles ved hjælp af andre metoder.

Udeladelse af mutationsforædling som sammenligningsgrundlag

Den væsentligste mangel/udeladelse i rapporten er, at den konventionelle brug af inducerede mutanter i planteforædlingen slet ikke omtales. I traditionel planteforædling induceres mutationer vha. stråling eller kemisk behandling. Ved de nye metoder induceres mutationer ved f. eks. SDN-1. De traditionelle metoder har været udbredt i planteforædlingen i mange år, og mutationerne herfra findes vidt udbredt i dyrkede sorter, fordi de spredes gennem den almindelige krydsning af kendte sorter for at optimere egenskaber. Det gælder bl.a. egenskaber som plantehøjde og blomstringstidspunkt. Denne udeladelse er især væsentlig, fordi den mest relevante sammenligning mellem mutationer fremkaldt ved genom-redigering (dvs. SND1 uden indsættelse af fremmed DNA-materiale) ville være til de konventionelle mutationer induceret ved stråling eller kemisk behandling. Det er velkendt, at de primære planter, som muteres ved de traditionelle metoder, indeholder tusindvis af mutationer, og dermed også et meget stort antal ikke-tilsligtede mutationer. Szarejko *et al.* (2017) angiver, at der i en mutantpopulation af byg let kan være op til 10.000 forskellige mutationer i samme plante fordelt over hele genomet ved en mutationstæthed på 1/500kb DNA. I allopolyploide arter kan tætheden af kemisk inducerede mutationer være endnu højere. Krasileva *et al.* (2017) rapporterede således en mutationstæthed på 1/33 kb DNA i hexaploid hvede, svarende til op til 5351 mutationer i hver mutantlinje, primært enkelt-baseændringer, alene i de kodende områder af genomet (exomet). Mutationer fremkaldt ved stråling er ikke undersøgt i samme detaljeringsgrad som kemisk inducerede mutationer, men det er velkendt, at bestråling kan fremkalde store kromosomale ændringer, f.eks. translokationer mellem kromosomer, som tidligere har været anvendt målrettet i bygforædling (Gustafsson *et al.*, 1971). Et studie i ris (Morita *et al.*, 2009) viste en blanding af enkelt-base mutationer og store kromosomdeletioner efter gamma-bestråling, en hyppigt anvendt metode i mutationsforædling.

I den konventionelle mutationsforædling er det sjældent, at en mutant kan anvendes direkte som en ny sort efter mutagenbehandling, netop på grund af de mange samtidige mutationer i de behandlede planter. Typisk vil en mutantplante, med den ønskede mutation, indgå i et større tilbagekrydsningsprogram, som har til formål at "fortynde" alle de uønskede mutationer væk, indtil en ønsket fænotype er opnået. FoE rapporten undlader at nævne dette, og at det også vil være en metode at anvende med CRISPR/Cas9 mutationer.

Forekomst af uønskede on- og off-target hændelser kan undersøges

Rapporten præsenterer korrekt, at der kan forekomme mange typer af kromosomændringer efter genredigering, på tværs af dyre- og plantesystemer, hvad angår de såkaldte on-target ændringer, dvs. det sted i genomet, hvor man tilsigter en ændring. Dette er rapporteret i adskillige tilfælde. I forhold til planteforædlingen undlader rapporten dog at nævne, at man netop kan undersøge denne variation og derfra gå videre i udviklingen af nye sorter med den mest optimale variant. Mht. uønskede/ukendte off-target ændringer undlader rapporten at nævne metoder, hvormed man faktisk kan undersøge forekomsten af disse ændringer på DNA-niveau. Hvis man har godt kendskab til den fulde genom-sekvens, som man efterhånden har for de fleste større afgrødeplanter, kan man først undersøge potentielle off-targets (dvs. sekvensområder, der har stor lighed med on-target sekvensen). Men man kan også med fuld genom-sekventering lave grundige screeninger for forekomst af andre ukendte off-target ændringer.

I tabel 1 har vi sammenfattet informationer vedrørende undersøgelser af off-target mutationer ved CRISPR i afgrødeplanter. Den indeholder kun eksempler, hvor man har fundet off-target mutationer. Sammenholdt med de ovenfor beskrevne informationer om omfanget af mutationer ved traditionel mutagenese, må det konkluderes at de undersøgte CRISPR inducerede mutationer ikke overstiger omfanget af mutationer ved traditionel mutagenese. Det må på den anden side også konkluderes, at der for en række CRISPR muterede afgrøder ikke er foretaget dybere analyser for eventuelle off-target mutationer. Det er derfor i flere tilfælde ikke muligt at vurdere off-target mutationsfrekvensen ved CRISPR. I denne sammenhæng må det dog nævnes, at mutanter fremkommet ved klassisk kemisk eller fysisk mutagenese sædvanligvis heller ikke systematisk undersøges for off-target mutationer. En forskningsindsats, hvor mutationer fremkommet ved SDN-1 gen-redigering sammenlignes med konventionel mutationsforædling, kunne være ønskelig for i større omfang at kunne afdække den genetiske basis for nuværende og potentielt fremtidige afgrøder og vurdere de nye teknikker i den rette kontekst.

Tabel 1. Oversigt over studier af off-target mutationer fremkommet ved CRISPR i afgrøder.

Reference	Art	Metode	Formodede (ofte baseret på software)	Homologe gener
Xie and Yang 2013	Ris	Stabil CRISPR/Cas9	off-target mutation i 1 ud af 3 potentielle med frekvensen 1.6%	
Jacobs et al 2015	Sojabønne	Stabil CRISPR/Cas9	3 ud af 15 potentielle off-target sites med 2 til 6 mismatches viste off-target mutationer med varierende frekvens	
Zhang et al 2014	Ris	Stabil CRISPR/Cas9	Ved sekventering af 13 formodede off-target sites fandt man 1 off-target mutation	
Endo et al 2014	Ris	Stabil CRISPR/Cas9		For en gRNA fandt de off-targets i 1 ud af 2 homologe gener med en frekvens på 6.25%. For en anden gRNA fandt de off-targets i 1 ud af 3 homologe gener med en frekvens på mindre end 5%.
Zhang et al 2016	Hvede	Stabil CRISPR/Cas9	Software forudsagde 8 potentielle off-target sites (med 3-4 bp mismatches) for en specifikt gRNA. Ingen off targets	

		Transient DNA CRISPR/Cas9 Transient RNA CRISPR/Cas9	i disse i 67 CRISPR/Cas9 mutanter	
Zhang et al 2016	Hvede	Stabil CRISPR/Cas9 Transient DNA CRISPR/Cas9 Transient RNA CRISPR/Cas9	Software forudsagde 24 potentielle off-target sites (med 2 til 5 bp mismatches) for en specifikt gRNA. Ingen off targets i disse i 101 CRISPR/Cas9 mutanter	
Zhang et al 2016	Hvede	Stabil CRISPR/Cas9 Transient DNA CRISPR/Cas9 Transient RNA CRISPR/Cas9		De undersøgte også off-targets i et homeologt gen til gRNA med 1 mismatch. Her anvendtes 3 forskellige metoder: Stabil transformation med DNA, transient transformation med DNA og transient med RNA og de fandt off targets i hhv 1.1%, 1.1% og 0.4% af de undersøgte CRISPR/Cas9 mutanter
Li et al 2016	Ris	Stabil CRISPR/Cas9	4 gRNA undersøgt med 2 potentielle off-target sekvenser af alle 4. Ud af disse 8 undersøgte sekvenser fandt de off-target mutationer i 3 potentielle off-target sekvenser. For alle blev 40 planter sekventeret og for de tre fandt de mutationsfrekvenser på 67.5%, 2.5% og 47.5%	

Forståelse af den konventionelle planteforædling

Der fremkommer i rapporten en vis idealisering af den konventionelle planteforædling som en "naturlig" aktivitet, som er foregået i tusinder år ved at bygge på kønnet formering med efterfølgende selektion for ønskede egenskaber i afkommet (s.8). Det udelades dermed, at der er sket en kraftig udvikling i effektiviteten af planteforædlingen de seneste mange årtier efter genopdagelsen af de mendelske arvelove. Især udelades omtale af inducerede mutationer ved hjælp af stråling eller kemisk behandling, som har været meget udbredt i planteforædlingen de seneste 50 år. Derudover omtales ikke en række andre nyere metoder i planteforædlingen, som kan betragtes som måder at omgå den naturlige kønnede formering på: forceret indkrydsning af fremmed gen-materiale fra nærtstående arter (fx translokationer fra rug indsat i hvedegenomet), syntetiske hexaploider i hvede, protoplastfusioner, induceret kromosomfordobling (bl.a. hyppigt anvendt i fremstilling af dobbelt-haploider), hybridforædling og en meget udbredt anvendelse af vævskulturer med regenerering af planter fra amorfe kalluskulturer. Vævskulturer er således langt fra begrænset til metoder, der involverer genredigering eller genteknologi, sådan som rapporten efterlader indtrykket af (s.10, 2. kolonne). Alle disse forædlingsmetoder, som forcerer og nogen gange overskrider naturligt forekommende måder, hvorpå planters arvmasse rekombineres, nævnes ikke i rapporten. Kun DNA-markørbaseret selektion nævnes mht. nye teknikker til at accelerere udviklingen af nye sorter (s.18).

DEL II: Genredigering og miljø

Grundlaget for den økologiske risikovurdering af GMO, som nu også er gældende for NBT (*New Breeding Technologies*) mutageneseteknikker, er retningslinjerne, ”*guidance*”, udformet af EFSA’s GMO panel (EFSA 2010). Økologisk risikovurdering af ”traditionelle” GMP’er vurderer specifikt, om de nye egenskaber, der er blevet indsat i en plante, har potentielt negative egenskaber. Risikovurdering af GMO kan kun foretages i konkrete tilfælde, dvs. for en ændring eller deletion i en given genetisk baggrund (genotype). Man kan således ikke risikovurdere den bioteknologiske fremgangsmåde generelt og kan således heller ikke generelt afvise en bioteknologisk fremgangsmåde. Man er nødt til at vurdere hver GMO – genotype/sort for sig selv, dvs. ved en *case-by-case* tilgang.

Den økologiske risikovurdering vurderer, om en modificeret plante forventes at kunne spredes uden for marken. Spredningen af genet kan ske som følge af krydsning med naturligt forekommende arter, eller ved at den egenskab, som er indsat, potentielt vil forbedre afgrødens mulighed for at etablere sig uden for markøkosystemet. Herved påvirkes de naturlige plantepopulationer. Eksempler på GMO-afgrøder, hvor der *a priori* forventes at være økologiske risici, er derfor afgrøder som flerårige GMO fodergræsser, fx *Lolium*, eller GMO-raps, som er blevet resistent over for en herbivor eller en sygdom. Disse GMO’er vil måske kunne invadere naturlige eller semi-naturlige habitater og udkonkurrere naturligt forekommende arter (Damgaard og Kjær 2009). Derudover vil GMO’en eventuelt kunne hybridisere med vilde slægtninge, hvilket kan betyde, at transgenet, som koder for resistens, vil blive selekteret og evt. fikseret lokalt i populationer af den vilde slægtning. Endelig kan spredningen af egenskaber give non-target effekter på planteædende insekter, der spiser planten, eller rester af den eller eksempelvis pollen fra planten i det tilfælde, at plantens pollen er giftige.

I FoE-rapporten bliver der lagt et stort fokus på ”off-target”-effekter af målrettede mutageneseteknikker. Hermed menes, at der opstår ændringer i genomet, som ikke er placeret i det område af genomet, det var intentionen at ændre. Herved kan den nye plante få nye egenskaber, der kan have negative effekter for mennesker og husdyrs sundhed eller for miljøet. Det samme vil gøre sig gældende for planter frembragt ved traditionelle mutagenesemetoder. Som det er redegjort for oven for, så bliver transgene planter risikovurderet ud fra den indsatte egenskab, så den eventuelle ”unintended effect” vil ikke blive specifikt undersøgt. Den kan blive opdaget i de test, der udføres som input til risikovurderingen, men det er ikke sikkert at det sker, da man netop ikke ved, hvad man skal lede efter, endsige teste for. Derudover vil den kun blive opdaget, ifald det efterfølgende bliver registreret i et overvågningsprogram.

FoE’s kritik vedrørende manglende vurdering af de miljømæssige effekter på biodiversitet retter sig især mod forhold i USA, mens EFSA’s *guidance* for EU imødegår kritikken i dens meget detaljerede beskrivelse af risikovurderingen. Eksempelvis, når plantemateriale udviklet med NBT i problemformuleringen vurderes at komme i kontakt med *non-target* organismer i jord, afføder det en række tests på repræsentative organismegrupper inklusive regnorme og leddyr. Derved dækkes også mulige effekter på jordbundsvertebraterne af både de tilsigtede og eventuelle utilsigtede ændringer i planten, da der altid sammenlignes med en isogen kontrol-sort, som ikke er ændret ved NBT, dvs. en non-NBT version af samme NBT sort. Eksisterende viden om NBT sorten vil indgå, og findes der ingen viden, som p.t. er tilfældet, vil den økologiske risikovurdering kræve at denne viden bliver tilvejebragt. På nuværende tidspunkt er der ikke økologisk viden om NBT planter, da de ikke har været tilgængelige for økologiske undersøgelser. Ud fra den i del I beskrevne mutagenefrekvens ved traditionel mutagene vs NBT forventes det fra et miljøvurderingsperspektiv, dog ikke, at utilsigtede ændringer i planten, pga. off-target effekter ved brug af de nye mutageneseteknikker, er mere sandsynlige end de er ved traditionelle mutageneseteknikker.

Sammenfattende vurdering:

Rapporten, som primært retter sig mod situationen i USA, fremstår overordnet ubalanceret med et særligt fokus på herbicidresistens som problematisk egenskab. Der nævnes intet om teknikkers potentialer for at forbedre afgrøders egenskaber i forhold til f. eks. sundhedsfremme, sygdomsresistens og klimatilpassede sorter. Mange af de eksempler, som rapporten giver på uønskede mutationer og effekter efter anvendelse af genom-redigering, er fra andre systemer end planter. Rapporten fremstår ude af kontekst, selvom der refereres til videnskabelige referencer.

Selvom kemisk og fysisk inducerede mutationer er blevet udført i årtier i vores afgrøder omfattes de ikke af rapporten. Det vurderes som yderst problematisk, at rapporten slet ikke inkluderer klassiske mutageneseteknikker og dermed sætter de nye teknikker ind den eksisterende kontekst.

Der forekommer givetvis langt færre uønskede mutationer ved SDN1 end ved de traditionelle mutationsteknikker, hvor der forekommer 1000-vis af off-target mutationer. Endvidere undlader rapporten at nævne metoder, hvormed man faktisk kan undersøge forekomsten af uønskede/ukendte off-target ændringer på DNA-niveau.

En forskningsindsats, hvor mutationer fremkommet ved SDN-1 gen-redigering sammenlignes med konventionel mutationsforædling, kunne være ønskelig, for i større omfang at afdække den genetiske basis for nuværende og potentielt fremtidige afgrøder og vurdere de nye teknikker i den rette kontekst.

Der fremkommer i rapporten en vis idealisering af den konventionelle planteforædling som en "naturlig" aktivitet, som er foregået i tusinder år ved at bygge på kønnet formering med efterfølgende selektion for ønskede egenskaber i afkommet. Det udelades dermed, at der er sket en kraftig udvikling i effektiviteten af planteforædlingen de seneste mange årtier efter genopdagelsen af de mendelske arvelove. Især udelades omtale af inducerede mutationer ved hjælp af stråling eller kemisk behandling, som har været meget udbredt i planteforædlingen de seneste 50 år.

For tiden er der ikke nogen væsentlig forskning i miljøeffekter af mutageneseteknikkerne, men den vil blive efterspurgt via krav fra risikovurderingen, når der kommer ansøgninger om markedsføring og dyrkning. Det forventes, at der kommer forskningsresultater, efterhånden som kommercielle sorter bliver tilgængelige, samt fra forskningsprojekter, der inddrager økologisk effekt- og risikovurdering.

Fra et miljøvurderingsperspektiv, forventes det ikke, at utilsigtede ændringer i planten, pga. *off-target* effekter ved brug af de nye mutageneseteknikker, er mere sandsynlige end de er ved traditionelle mutageneseteknikker.

Referencer:

Brinch-Pedersen et al. 2018. <http://dca.au.dk/aktuelt/nyheder/vis/artikel/ny-rapport-saetter-fokus-paa-praecisionsforaedling>

Canadian Food Inspection Agency (2013). DD 2013-100: Determination of the Safety of Cibus Canada Inc.'s Canola (*Brassica napus* L.) Event 5715. www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/approved-under-review/decision-documents/dd-2013-100/eng/1427383332253/1427383674669#a45.

Damgaard, C. and C. Kjær (2009). Competitive interactions and the effect of herbivory on Bt-*Brassica napus*, *Brassica rapa* and *Lolium perenne*. *Journal of Applied Ecology* **46**, 1073–1079.

EFSA Panel on Genetically Modified Organisms, GMO (2010). Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified plants. *EFSA Journal* 8(11):1879, 111.

Endo, M., M. Mikami, and S. Toki. 2014. Multigene knockout utilizing off-target mutations of the CRISPR/Cas9 system in rice. *Plant Cell Physiol.* 56:41–47.

Gustafsson Å, Hagberg A, Persson G, Wiklund K. 1971. Induced mutations and barley improvement. *Theoretical and Applied Genetics* 41, 239-248.

Jacobs, T.B., P.R. LaFayette, J.R. Schmitz, and W.A. Parrott. 2015. Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9. *BMC Biotechnol.* 15:16.

Krasileva KV, Vasquez-Gross HA, Howell T, Bailey P, Paraiso F, Clissold L, Simmonds J, Ramirez-Gonzalez RH, Wang X, Borrill P, Fosker C, Ayling S, Phillips AL, Uauy C, Dubcovsky J. 2017. Uncovering hidden variation in polyploid wheat. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, E913-E921.

Li, M., Li, X., Zhou, Z., Wu, P., Fang, M., Pan, X., Lin, Q., Luo, W., Wu, G., ... Li, H. (2016). Reassessment of the Four Yield-related Genes Gn1a, DEP1, GS3, and IPA1 in Rice Using a CRISPR/Cas9 System. *Frontiers in plant science*, 7: 377

Morita R, Kusaba M, Iida S, Yamaguchi H, Nishio T, Nishimura M. 2009. Molecular characterization of mutations induced by gamma irradiation in rice. *Genes & Genetic Systems* 84, 361-370.

Szarejko I, Szurman-Zubrzycka M, Nawrot M, Marzec M, Gruszka D, Kurowska M, Chmielewska B, Zbieszczek J, Jelonek J, Maluszynski M. 2017. Creation of a TILLING Population in Barley After Chemical Mutagenesis with Sodium Azide and MNU. In: Jankowicz-Cieslak J, Tai TH, Kumlehn J, Till BJ, eds. *Biotechnologies for Plant Mutation Breeding: Protocols*. Cham: Springer International Publishing, 91-111.

Xie, K., and Y. Yang. 2013. RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. *Mol. Plant* 6:1975–1983.

Zhang, H., J. Zhang, P. Wei, B. Zhang, F. Gou, Z. Feng, Y. Mao, L. Yang, H. Zhang, N. Xu, and J.K. Zhu. 2014. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnol. J.* 12:797–807.

Zhang, Y., Liang, Z., Zong, Y., Wang, Y., Liu, J., Chen, K., Qiu, J., & Gao, C. (2016). Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. *Nature communications* 7:12617