



# **Noi tehnici de ameliorare bazate pe biotehnologie**

**Prof. univ.dr. Elena Marcela Badea**



## **Cele mai importante evenimente din istoria ameliorării plantelor**

- 1865 Principiile Geneticii Mendeliene
- 1923 Primul hibrid de porumb
- 1960 “Revoluția Verde” (soiuri, îngrășăminte, pesticide)
- 1983 Primele plante transgenice
- 2008 Primele plante cu genomuri editate



# Transgenice sau netransgenice?

- Având în vedere progresul științific și tehnic în biotehnologie, ca urmare a solicitărilor Autoritaților competente ale Statelor Membre, Comisia Europeană a instituit, în anul 2007, un Grup de lucru cu misiunea de a evalua posibilitatea ca unele dintre noile tehnici de ameliorare să cadă sub incidența legislației care reglementează organismele modificate genetic (OMG).



# Noi tehnici de ameliorare bazate pe biotehnologie

- Tehnologia Nucleazelor Zinc finger
- Mutageneza mediată de oligonucleotide
- Cisgeneza sau intrageneza
- Metilarea ADN mediată de ARN
- Altoirea
- Ameliorarea inversă
- Agro-infiltrarea
- Genomica sintetică



# Conform grupului de lucru al UE, noile tehnici pot fi grupate în trei categorii

## **I. Introducerea tranzientă a ADN recombinat**

1. Mutageneza situs - direcționată cu Nucleaze Zinc Finger (NZF)
2. Mutageneza mediată de oligonucleotide
3. Agro-infiltrarea

Aceste procese se aseamănă cu transgeneza (recombinarea ADN *in vitro* și transferul lui prin diferite metode), dar produsele finite sunt similare cu plantele obținute prin metode convenționale de ameliorare. Prin urmare, noile produse sunt în cele mai multe cazuri nedetectabile.

## **II. Introducerea stabilă a ADN recombinat într-o etapă intermediară a procesului de obținere a unui nou produs**

1. Mutageneza situs - direcționată cu nucleazele Zinc finger cu ADN donor
2. Metilarea ADN mediată de ARN
3. Ameliorarea inversă

Plantele intermediare sunt modificate genetic, dar produsele finite sunt similare cu plantele obținute prin metode convenționale de ameliorare. Prin urmare, nici noile produse obținute prin aceste tehnici nu sunt, în cele mai multe cazuri, detectabile.



# Conform grupului de lucru al UE, noile tehnici pot fi grupate în trei categorii

## III. Integrarea stabilă a ADN recombinat

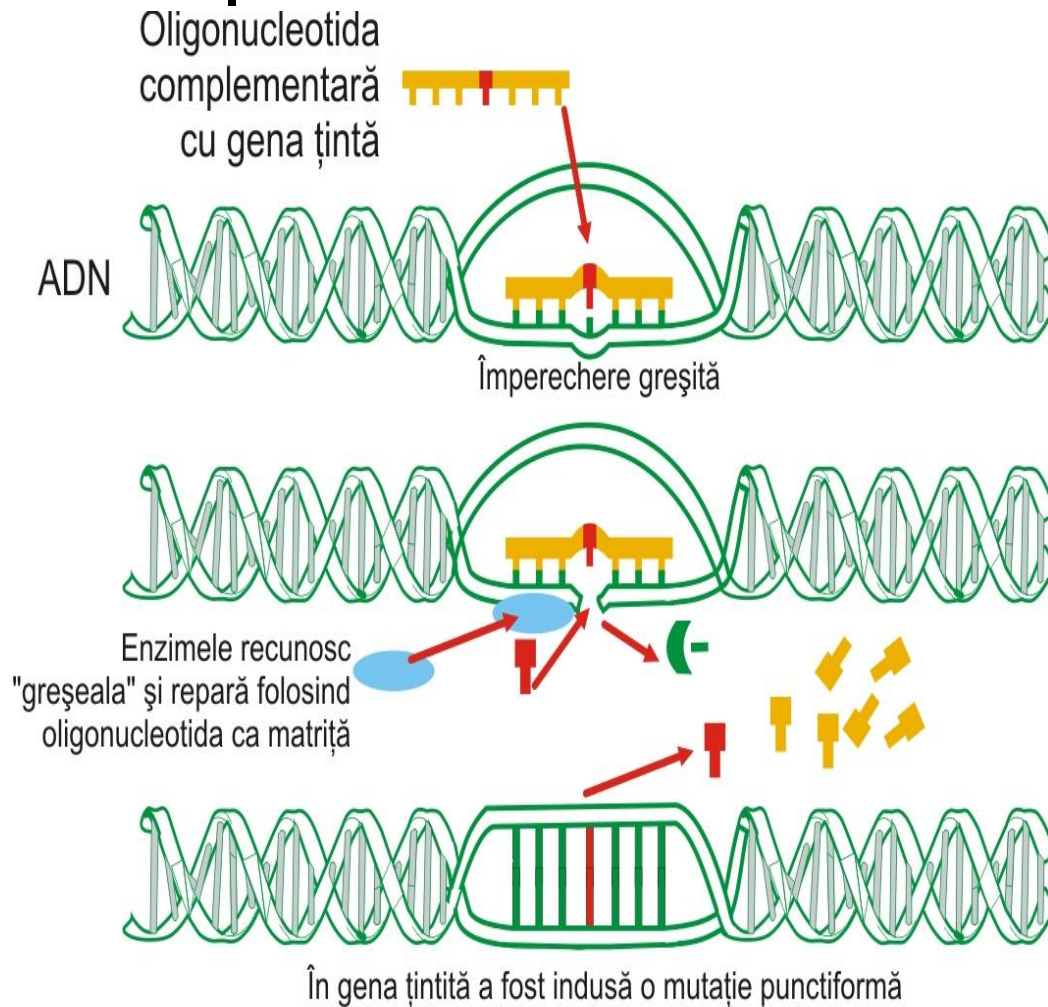
1. Cisgeneza

2. Intrageneza

3. Mutageneza situs - direcționată cu Nucleaze Zinc Finger

Procesul prin care se obțin plante cisgenice se aseamănă cu transgeneza (inserția la întâmplare a ADN), dar, și în acest caz, produsele finite sunt similare cu plantele obținute prin metode convenționale de ameliorare. Prin urmare, detectarea lor ar putea fi dificilă.

# I. Mutageneza direcționată de oligonucleotide (ODM)



- Utilizează oligonucleotide pentru inducerea țintită (situs-specifică) a unor mutații punctiforme
- Gena este modificată fără integrarea ADN în genom
- Modificările sunt făcute la nivelul materialului genetic al organismului prin mecanismele proprii de reparare



# Tehnologia Rapid Trait Development System (RTDS)

- Compania Cibus a lansat în SUA primul său produs comercial, **SU Canola**<sup>™</sup>, o rapiță netransgenică tolerantă la erbicidele sulfonilureice, obținută prin tehnologia mutagenezei direcționate de oligonucleotide. Tehnologie pe care a denumit-o **Rapid Trait Development System**.
- Tot compania Cibus și-a propus ca, aplicând RTDS, în următorii 10 ani, să obțină plante netransgenice cu o gamă variată de însușiri la cele mai importante specii cultivate.

<http://www.cibus.com/about.php>





# Tehnologia Nucleazelor Zinc finger

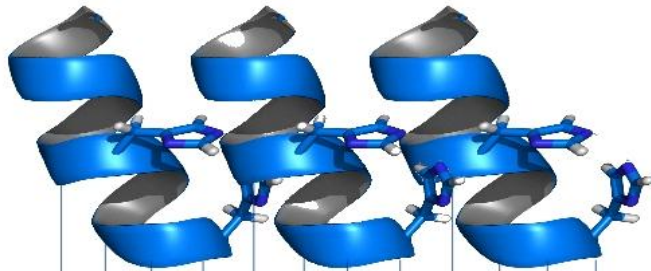
- Utilizează Nucleaze Zinc finger sintetizate artificial pentru introducerea unor mutații situs-specifice, adiția sau inactivarea situs-specifică a unor gene, înlocuirea unei gene sau cumulara mai multor gene (stacking) în genomurile plantelor.
- În ameliorarea plantelor se pot folosi trei variante ale acestei tehnologii: NZF-1, NZF-2 și NZF-3.



# NZF (Nucleazele Zinc Finger)

- Se obțin prin fuziunea unei nucleaze, care taie ADN dublu catenar, cu un domeniu Zinc Finger al unui factor de transcripție astfel conceput încât să se atașeze unei secvențe specifice, aflate într-un anumit locus.
- Cu alte cuvinte, domeniul funcționează ca un instrument de direcționare a nucleazei cu care este fuzionat spre o anumită secvență, care trebuie clivată, din genomul complex.
- Existența mecanismului endogen de reparare a ADN permite folosirea enzimelor Zinc Finger pentru a face modificări situs - specifice și permanente în genom.

# Foarfecea moleculară



Domeniul pentru  
clivarea ADN

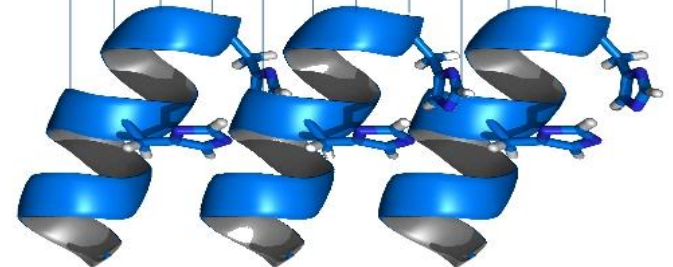
Fok 1 

ATAAGCGACCAA

Domeniul pentru  
atașarea la o secvență  
specifică de nucleotide

 Fok 1

AACCAAGATA





# I. NZF-1

- Într-o primă variantă, genele care codifică Nucleazele ZF-1 sunt introduse în celule fără o matriță pentru repararea ADN.
- Nucleazele ZF-1 recunosc în celule locul țintă pentru care au fost „concepute” și taie ADN la nivelul respectiv, generând rupturi dublu catenare situs-specifice.
- Prin generarea rupturilor dublu catenare este indus procesul natural de reparare a ADN prin recombinare neomoloagă.
- Recombinarea neomoloagă determină modificări, constând din scurte deleții sau inserții, la nivelul uneia sau al câtorva perechi de baze.

# I. Agro-infiltrarea

Diagnostic test  
with *A. tum.*



Selection of  
desired plants



Seeds



- Utilizează *Agrobacterium* pentru a injecta mai multe molecule de ADN în celulele plantei în vederea expresiei tranziente a unei gene de interes
- Este un sistem extrem de eficient pentru:
  1. evaluarea multor construcții genetice;
  2. a obține producții mari, în condiții de izolare, ale unor produse cu valoare adăugată

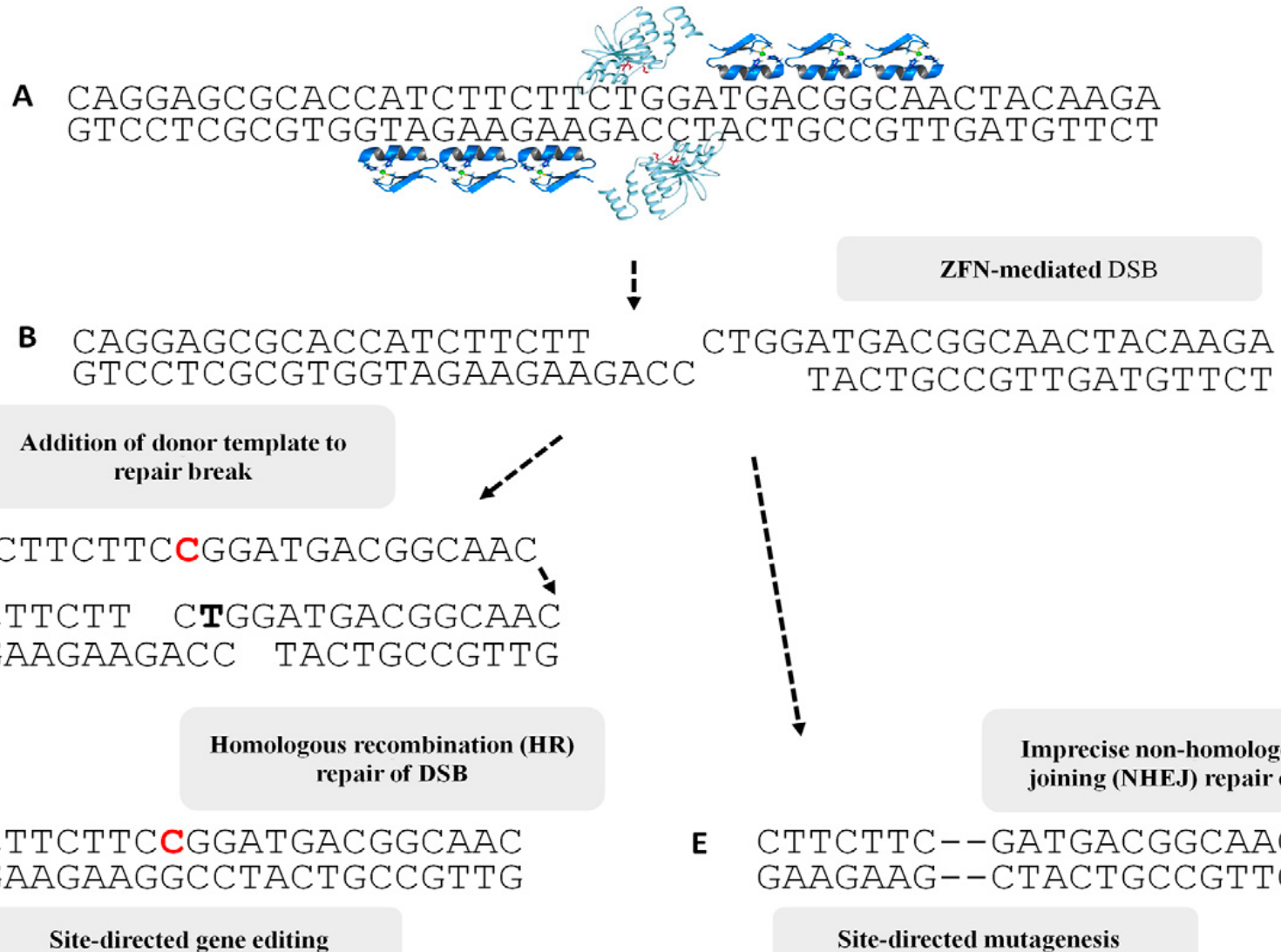


## II. NZF- 2

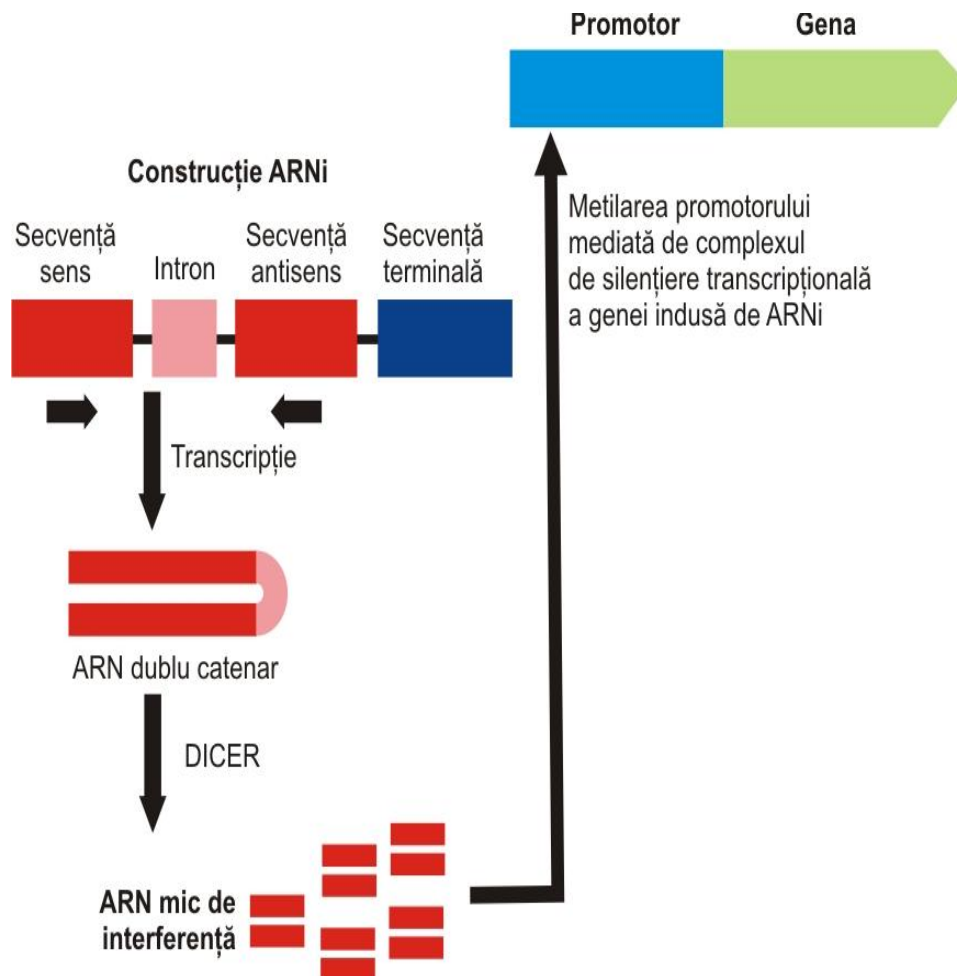
- Generează mutațiile punctiforme dorite prin procesul de reparare a ADN prin recombinare omoloagă.
- Într-o a doua variantă, genele care codifică Nucleazele ZF-2 sunt introduse în celule cu o matriță pentru repararea ADN, omoloagă cu regiunea țintită din genom, care acoperă mai multe kilobaze. NZF-2 se atașează de ADN și generează rupturi dublu catenare situs-specifice. Mecanismele naturale de reparare a ADN generează mutații la nivelul uneia sau al câtorva perechi de baze prin recombinare omoloagă și copierea matriței reparate.

# Tipuri de modificări situs-specifice ce pot fi realizate folosind nucleaze artificiale

THE PLANT GENOME □ JULY 2012 □ VOL. 5, NO. 2



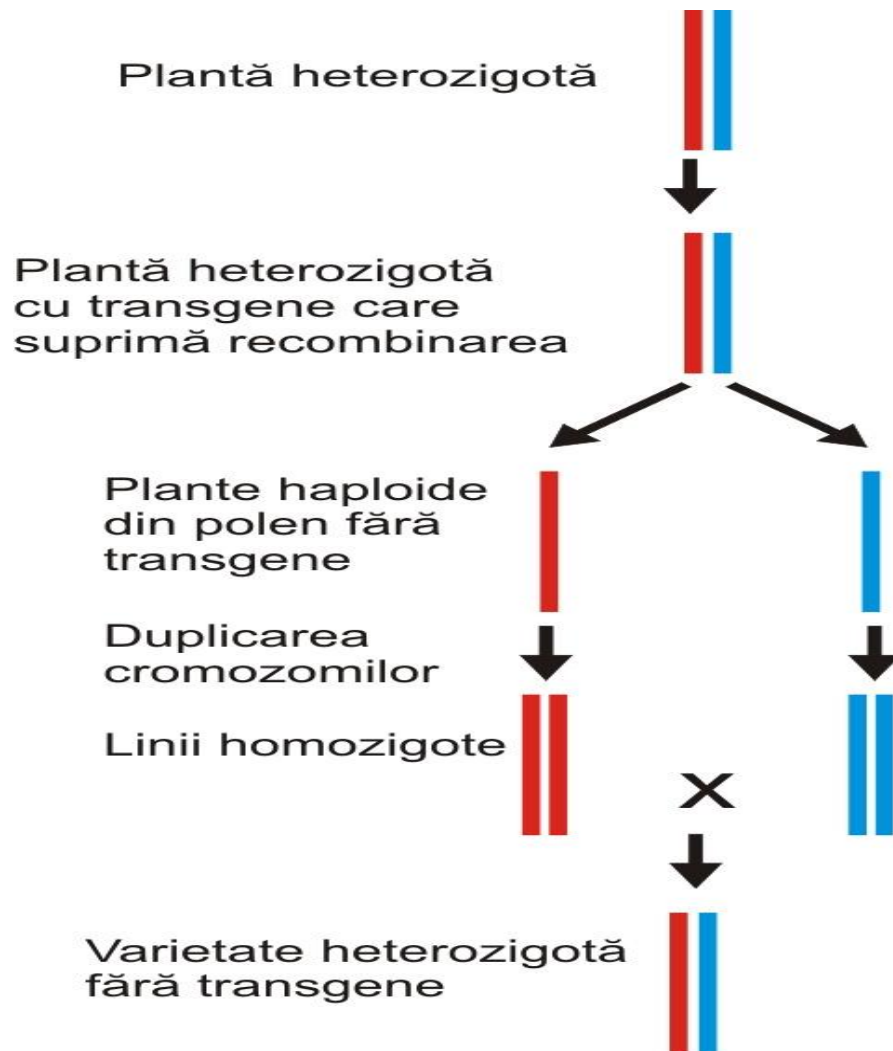
## II. Metilarea ADN dependentă de ARN



- Utilizează secvențe mici de ARN pentru a altera expresia genei prin metilarea unei secvențe specifice de ADN fără schimbări ale secvenței de nucleotide (schimbare epigenetică)
- Gene care codifică ARN, omoloage cu secvențe din genom, de ex. cu promotorul, sunt transferate în celulele plantei. Transcrise, vor genera ARN dublu catenar, transformat de complexe enzimatiche specifice, în ARN interferant mic. Acesta va metila și, implicit, va silenția secvențele omoloage
- Populația de ameliorare va include, ca urmare a segregării, și indivizi care nu mai conțin genele inserate în genom, dar păstrează caracterul modificat.
- Se poate aplica la caracterele care pot fi ameliorate prin pierderea funcției genei



## II. Ameliorarea inversă presupune inversarea ordinii evenimentelor ce conduc la producerea unei varietăți hibride



- Sunt reconstituite liniile parentale pornind de la o elită hibridă F1 al cărei material genetic nu se cunoaște.
- Combină mai multe tehnici: transgeneza, pentru blocarea recombinării în meioză, cultura de țesuturi, pentru a regenera plante din celule transformate, androgeneza, pentru obținerea haploizilor, și tehnici de dublare a haploizilor pentru a obține plante haploide dublate folosite ca linii parentale pentru a produce noi elite hibride F1.



## III.CISGENEZA

- Modificarea unui organism receptor cu o genă (cisgenă) izolată de la un donator cu care este sexual compatibil
- Poate fi asimilată cu procesul de introgresie
- **Cisgena nu se inseră în locusul în care ar avea loc și introgresia**



## III. Intrageneza

- Modificarea genetică a unui organism receptor care implică inserția regiunii codificatoare a unei gene, parțial sau total reorganizată, combinată frecvent cu un promotor și/sau regiunea care marchează sfârșitul transcripției de la altă genă aparținând **aceluiași grup de compatibilitate sexuală**
- Este limitată la modularea expresiei caracterelor native
- Este mult mai limitată decât transgeneza clasică și nu oferă avantaje științifice
- Nu introduce însușiri noi pentru grupul de compatibilitate sexuală respectiv



## III. NZF- 3

- Nucleazele zinc finger din această categorie sunt folosite pentru a introduce țintit transgene (insertii) prin recombinare omoloagă
- Ultima variantă presupune introducerea în celule vegetale a genelor care codifică NZF-3 specifice locului în care se urmărește integrarea unei anumite transgene, împreună cu fragmente de ADN sau cu casete lungi de mai multe kilobaze.
- Concret, se assemblează o moleculă de ADN recombinat care conține insertul, mai precis, informația care trebuie integrată. Insertul este delimitat de secvențe omoloage cu secvențele de ADN care flanchează locul în care va acționa NZF. Construcția - practic, un ADN donor - este inclusă la nivelul clivării dublu catenare. Acest ADN poate avea origine endogenă, poate fi omolog sau heterolog (provenit de la oricare altă specie).

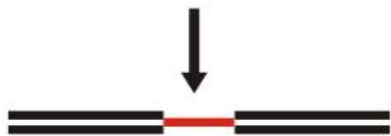
# Cu tehnologia NZF se induc mutații situs-specifice



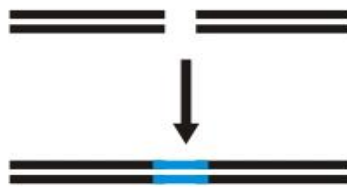
Pereche de nucleaze Zn finger



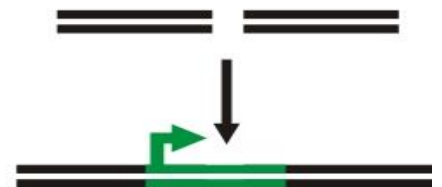
tăietură dublu catenară



inserții/deleții  
prin reunirea mutagenică a

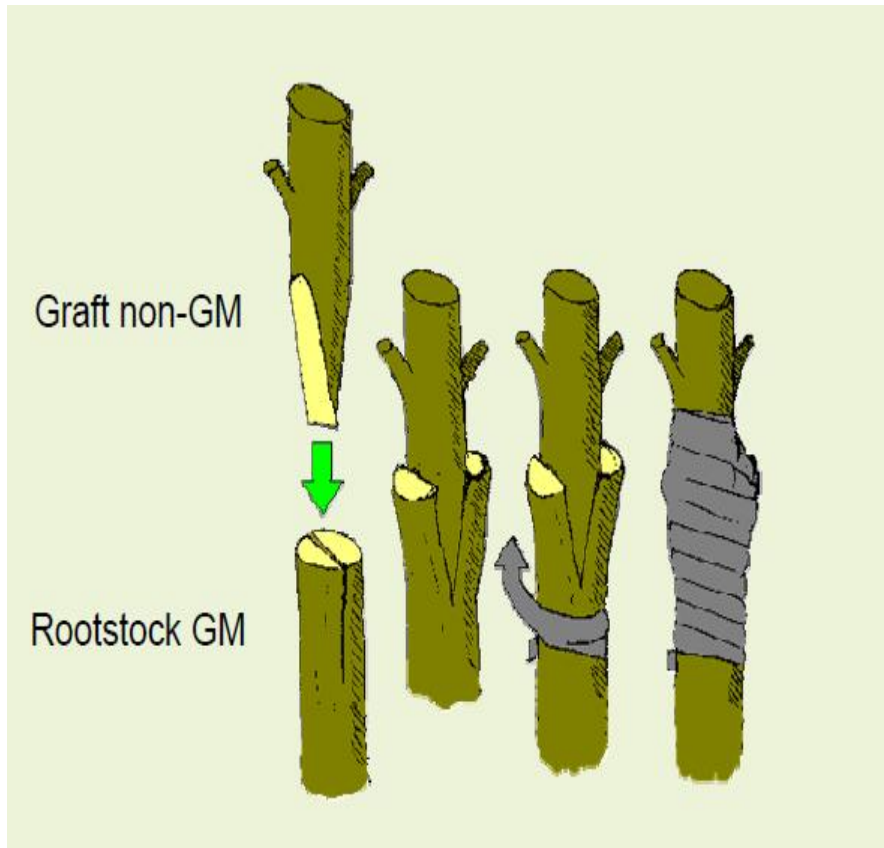


schimbări în gena vizată  
prin recombinare omoloagă

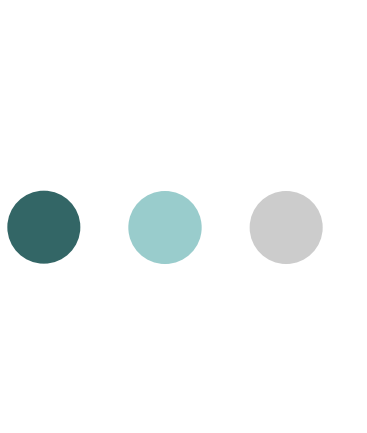


inserția unei transgene  
prin recombinare omoloagă

# III. Altoirea



- Altoirea pe portaltoi MG nu are ca rezultat prezența insertului în fructe, polen, semințe
- Prezintă un interes limitat în cazul speciilor la care nu se practică altoirea



# TEHNOLOGII DE EDITARE A GENOMULUI

Obținerea unei noi generații de PMG prin introducerea unor schimbări predeterminate (țintite) ale secvenței de nucleotide din ADN al genomului celular prin intermediul unor tehnici elaborate în ultimii ani



# Editarea genomului

- Include o serie de tehnici moleculare care permit inducerea unor schimbări direcționate (țintite) în genomurile organismelor.
- Denumită și “genome engineering” sau mutageneză situs-direcționată, poate:
  - modifica informația genetică pentru a crea noi însușiri;
  - îndepărta regiuni specifice din genomuri;
  - adăuga transgene (gene provenite de la alte organisme) în locuri specifice din genomuri.
- Pentru introducerea caracterelor dorite la plante, **este mai precisă** decât metodele convenționale de ameliorare și decât multe dintre metodele standard de inginerie genetică (transgeneză).

*[www.sciencemediacentre.org/genome-editing](http://www.sciencemediacentre.org/genome-editing)*





# Editarea genomului

- Modifică, cu precizie, nucleotidele (A, T, G, C) din informația genetică codificată folosind :
  1. “foarfeci moleculare” astfel modificate încât să taie ADN în locuri predictibile;
  2. mecanisme naturale celulare de reparare a ADN.

*[www.sciencemediacentre.org/genome-editing](http://www.sciencemediacentre.org/genome-editing)*



# 1. Tehnici aplicate pentru tăierea ADN dublu catenar. Nucleazele secvență-specifice

- Nucleazele pot fi astfel modificate încât să recunoască locuri specifice în genom și, tăind la nivelul respectivelor locuri, să stimuleze căile de reparare a ADN, care mediază editarea genelor.
- Pentru editarea genomului se folosesc 4 tipuri de nucleaze secvență - specifice :

1.Meganucleazele;

2.Nucleazele Zinc Finger (NZF) (Zinc Finger Nucleases);

3.TALEN (transcription activator - like effector nucleases), nucleaze efectori care acționează ca activatori transcripționali;

4. CRISPR)/Cas9 (clustered regularly interspersed short palindromic repeats), scurte repetiții palindrom intercalate în mod regulat.

Numai tehnologia Nucleazelor Zinc finger este în curs de evaluare de către grupuri de experți, pentru a se stabili dacă produsele finite obținute prin aplicarea ei pot fi considerate transgenice.

[www.sciencemediacentre.org/genome-editing](http://www.sciencemediacentre.org/genome-editing)

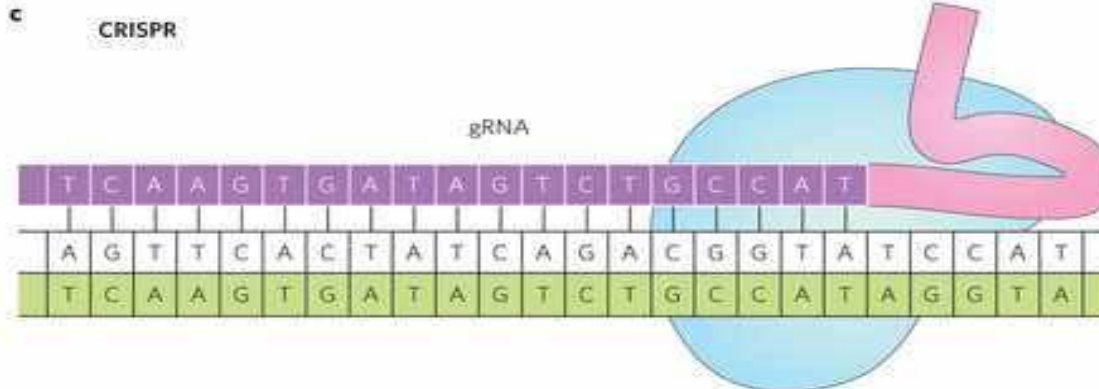
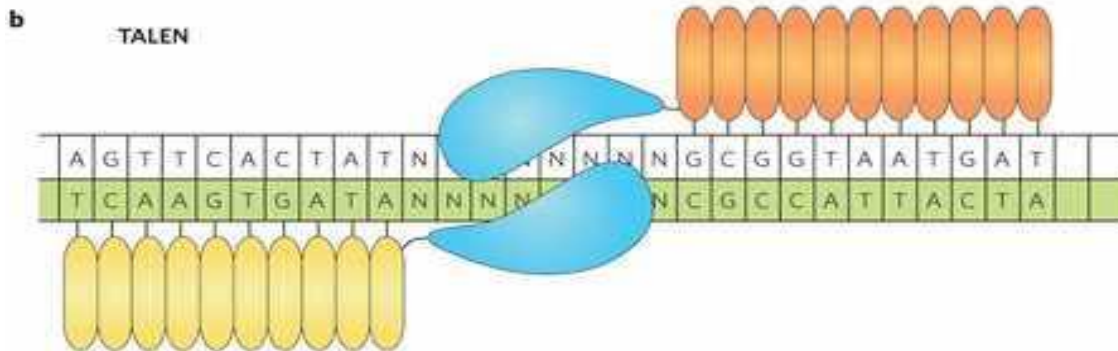
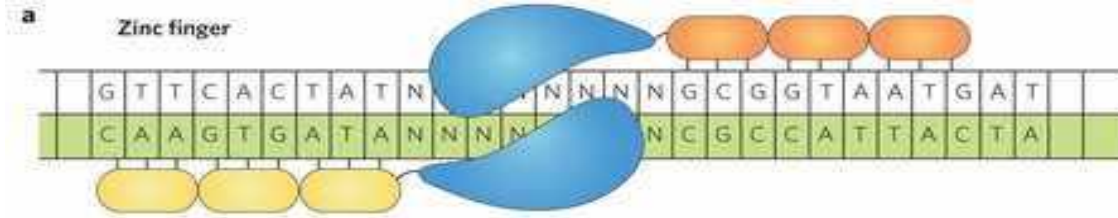


# Meganucleazele

- Spre deosebire de NZF și de TALEN, care au componente separate pentru recunoașterea și pentru tăierea ADN, meganucleazele includ ambele structuri.
- Meganucleazele se găsesc în natură și pot fi modificate, între anumite limite, pentru a ținti secvențe specifice.

# Nucleazele se atașează și taie ADN la nivelul unor secvențe specifice

NATURE PLANTS | VOL 1 | JANUARY 2015 |



› Fiecare nuclează este alcătuită dintr-un domeniu care taie ADN (colorat în albastru) și un domeniu de țintire a ADN (colorat în galben și orange).

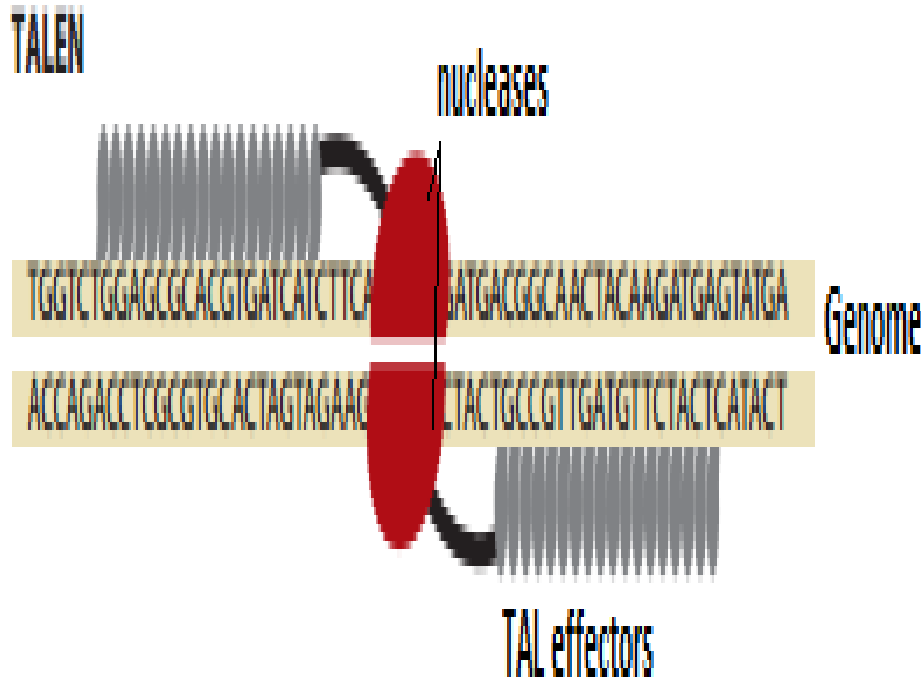
› La NZF și TALEN, domeniile de recunoaștere sunt proteine, iar la CRISPR, domeniul de recunoaștere este un ARN scurt de ghidare (ARNg).

› La toate cele trei nucleaze, domeniile de recunoaștere pot fi asamblate astfel încât să țintească locuri predeterminate din genom ce urmează să fie editate.

# TALEN

(transcription activator - like effector nucleases)

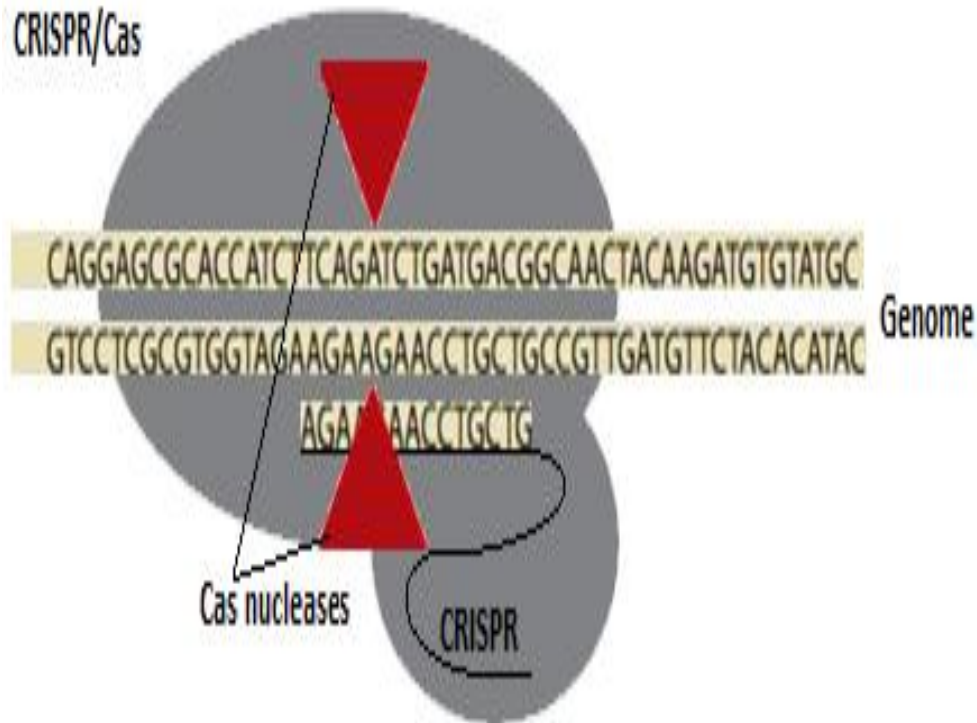
[www.sciencemediacentre.org/genome-editing](http://www.sciencemediacentre.org/genome-editing)



- Sunt proteine produse de bacteriile *Xanthomonas*, patogene pentru plante, care se atașează de secțiuni specifice din genomurile gazdelor.
- Pot fi reprogramate să țintească anumite secvențe din ADN și, prin fuziunea cu nucleaze, pot fi utilizate pentru clivarea ADN la fel ca NZF.
- TALEN pot face aproape tot ce fac și NZF, dar mai ieftin, mai repede și mai bine.

# CRISPR

(Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats) [www.sciencemediacentre.org/genome-editing](http://www.sciencemediacentre.org/genome-editing)



- Bacteriile posedă un sistem imunitar adaptativ unic, bazat pe un ARN care orientează o endonuclează pentru distrugerea ADN străin. Cu alte cuvinte, natura a creat și alte căi de interacțiune cu secvențe specifice de ADN, nu numai proteine care se leagă de ADN.
- CRISPRs pot fi ușor reprogramate în privința locului din genom în care trebuie să taie. Secvența de ADN țintă este furnizată de un scurt ARN, ceea ce face acest sistem mai ușor de implementat decât celelalte sisteme.



## 2. Tehnicile de reparare și editare

*[www.sciencemediacentre.org/genome-editing](http://www.sciencemediacentre.org/genome-editing)*

- **Recombinarea omoloagă (Homologous Recombination - HR)** presupune introducerea, pentru reparare, a unui fragment de ADN ca matriță (ADN donor), care conține secvența genetică dorită și poate fi folosit pentru a înlocui sau insera fie nucleotide, fie gene întregi.
- **Recombinarea neomoloagă (Non-Homologous End Joining - NHEJ)** nu necesită o matriță; în general, repară ADN cu exactitate și doar ocazional cu mici deleții sau inserții. Micile schimbări operate în genom stopează adesea funcționarea unei gene, generând un “knock out”. Recombinarea neomoloagă poate fi folosită, de asemenea, și pentru a insera sau deleta gene întregi.



# Metodele de obținere a plantelor mutante fără transgene cu Nucleaze Situs-Specifice (NSS)

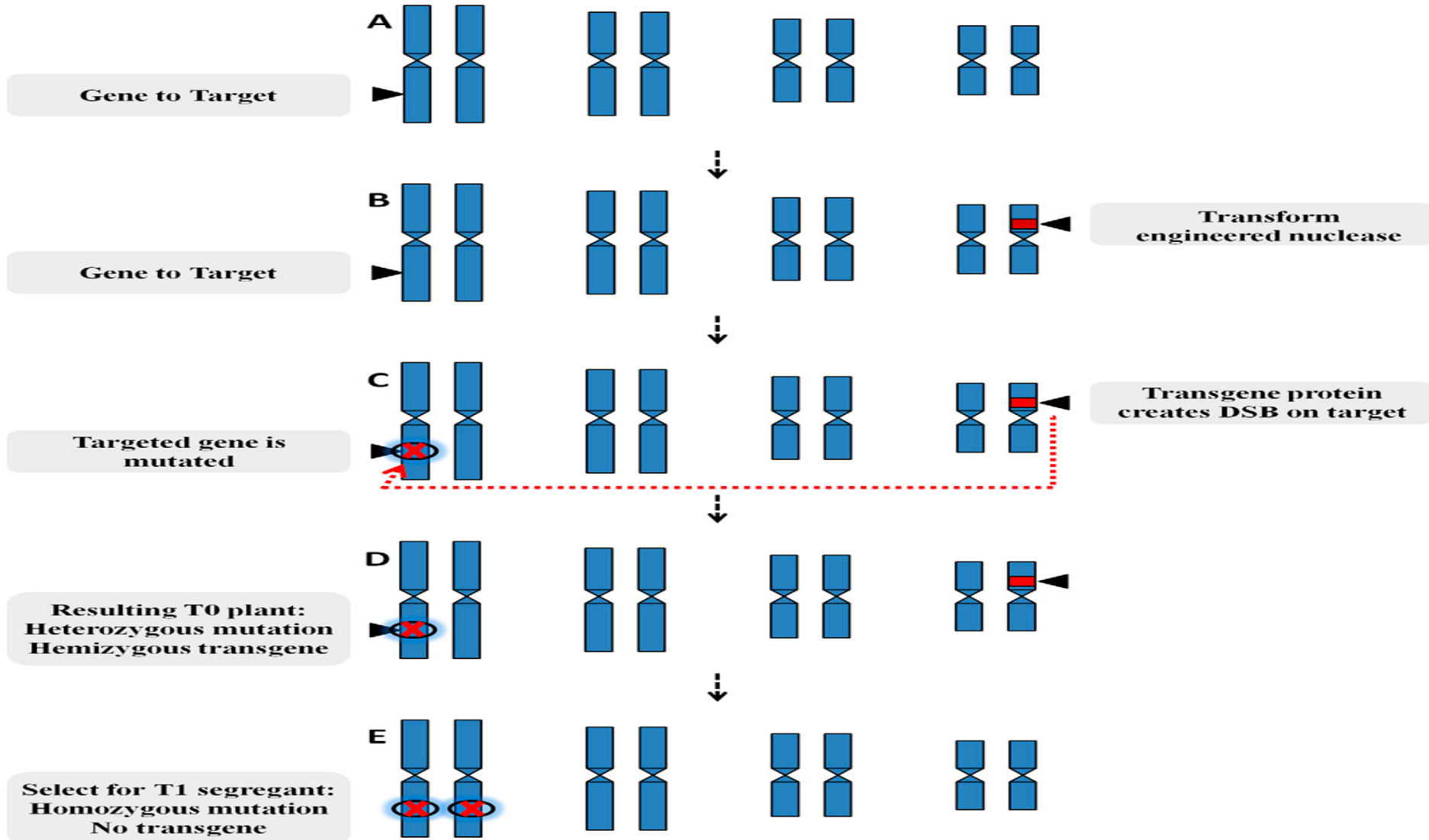
PLOS Biology | [www.plosbiology.org](http://www.plosbiology.org)

- Integrarea construcțiilor NSS în genomul plantei. Sintetizate prin exprimarea ADN integrat, NSS acționează la nivelul locusului pentru care au fost programate. Ulterior, NSS sunt eliminate, ca urmare a segregării în descendența plantelor MG, obținându-se o mutantă fără transgenă.
- Expresia tranzientă a NSS transferate în celule cu *Agrobacterium*, cu metoda biolistică sau prin transformarea protoplaștilor. NSS sunt sintetizate tranzient prin exprimarea construcțiilor, înainte ca ADN să fie degradat.
- Transferul tranzient al NSS sub formă de proteine sau ARNm. Nefiind transferate construcții, ADN străin nu este integrat în genom.
- Transferul tranzient al NSS cu vectori virali. Deoarece vectorii virali nu se integrează în genom, plantele mutante nu sunt transgenice.



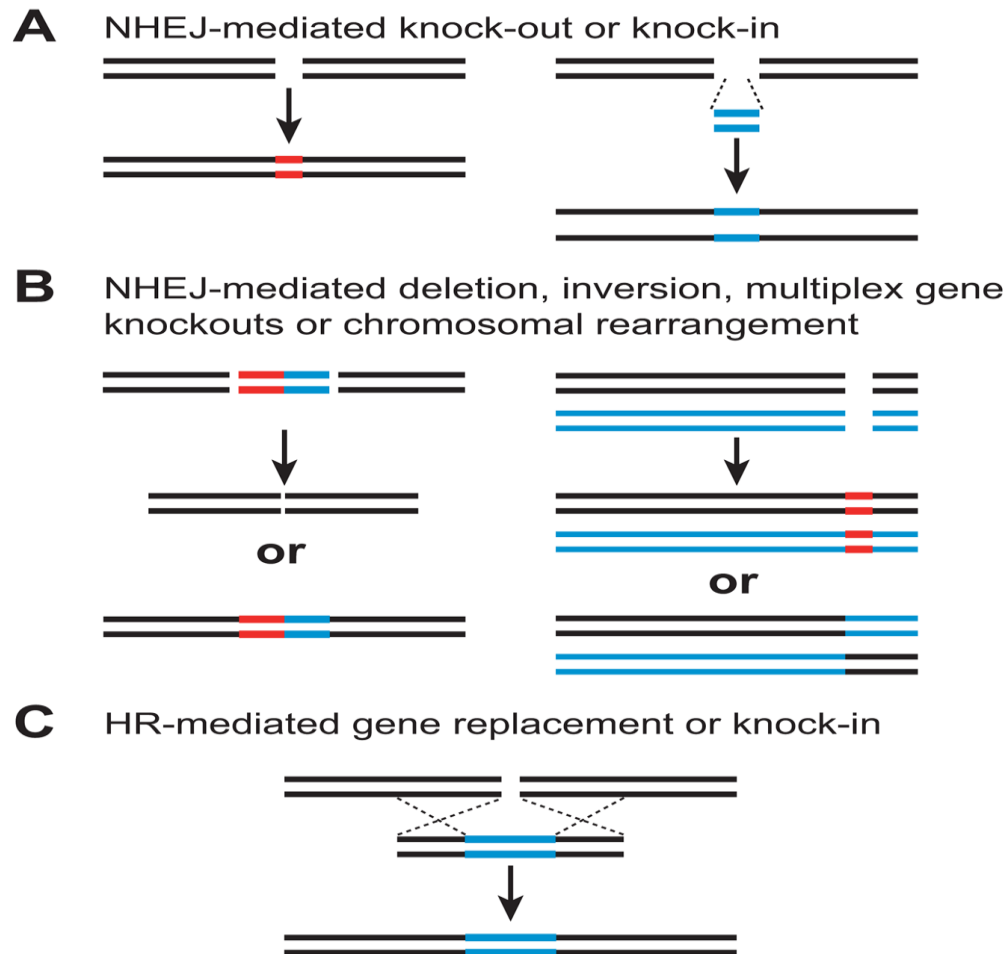
# O transgenă care codifică o nuclează artificială stimulează inducerea unei noi mutații

THE PLANT GENOME □ JULY 2012 □ VOL. 5, NO. 2



# Editarea genomului prin recombinare neomoloagă și omoloagă cu Nucleaze Secvență Specifice

e1001877. doi:10.1371/journal.pbio.1001877



- (A) Repararea mediată de recombinarea neomoloagă (NHEJ) poate genera în locurile țintă inserții sau deleții sau poate scoate din funcție o genă (knock-outs, stânga). Fragmente de ADN pot fi inserate *via* NHEJ pentru a crea inserții țintite (knock-in, dreapta).
- (B) Când NSS taie în două locuri, repararea *via* NHEJ poate induce deleții sau inversii ale unor regiuni genomice mari (stânga) sau deleții țintite ale unor gene ori translocării cromozomale (dreapta).
- (C) Repararea mediată de recombinarea omoloagă (HR), care implică o matriță ADN omoloagă, determină înlocuirea sau inserția unei gene.



# CRISPR/Cas oferă o serie de avantaje față de NZF și TALEN

Este un sistem simplu, ieftin, ușor de programat și incredibil de eficient.

Geneticianul George Church, de la Universitatea Harvard, unul dintre primii cercetători care au demonstrat utilitatea sistemului pentru editarea genomului, a spus: “It came out of the blue for everybody,” “It’s a real gift from biology.”

- În numărul din august 2013 al revistei Nature Biotechnology, 3 lucrări scurte au descris **primele aplicații** ale sistemului Cas9/sgRNA pentru modificarea genomului plantelor.
- Sistemul a fost aplicat la plantele model (*Arabidopsis*, *Nicotiana benthamiana*) și la plante de cultură (grâu, orez și sorg) prin transformare tranzientă sau stabilă (Belhaj et al. 2013; Feng et al. 2013; Jiang et al. 2013; Li et al. 2013b; Mao et al. 2013; Miao et al. 2013; Nekrasov et al. 2013; Shan et al. 2013b; Xie and Yang 2013).

# Grâu cu genom editat cultivat în seră

NATURE PLANTS | VOL 1 | JANUARY 2015 |

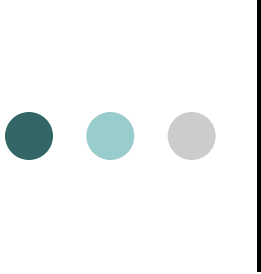




# Editarea genomului: aplicații

Biotechnology Advances 33 (2015) 41–52

- Accelerează procesul de ameliorare deoarece face posibilă introducerea unor modificări predictibile și exacte (precise) direct în germoplasma elită. Toate operațiunile de editare a genomului pot fi parcurse foarte rapid, în decursul a numai trei generații.
- Prin aplicarea sistemului CRISPR/Cas9 pot fi modificate simultan mai multe caractere.
- Companiile mici ar putea să producă noi soiuri foarte rapid, cu costuri mult mai mici decât în prezent, chiar și în cazul unor specii la care încă nu au fost aplicate metodele biotehnologiei moderne, cum sunt avocado, sorgul sau plantele decorative.



# Aplicații și implicații ale utilizării Nucleazelor Secvență-Specifice (NSS) în ameliorarea plantelor

Biotechnology Advances 33 (2015) 41–52

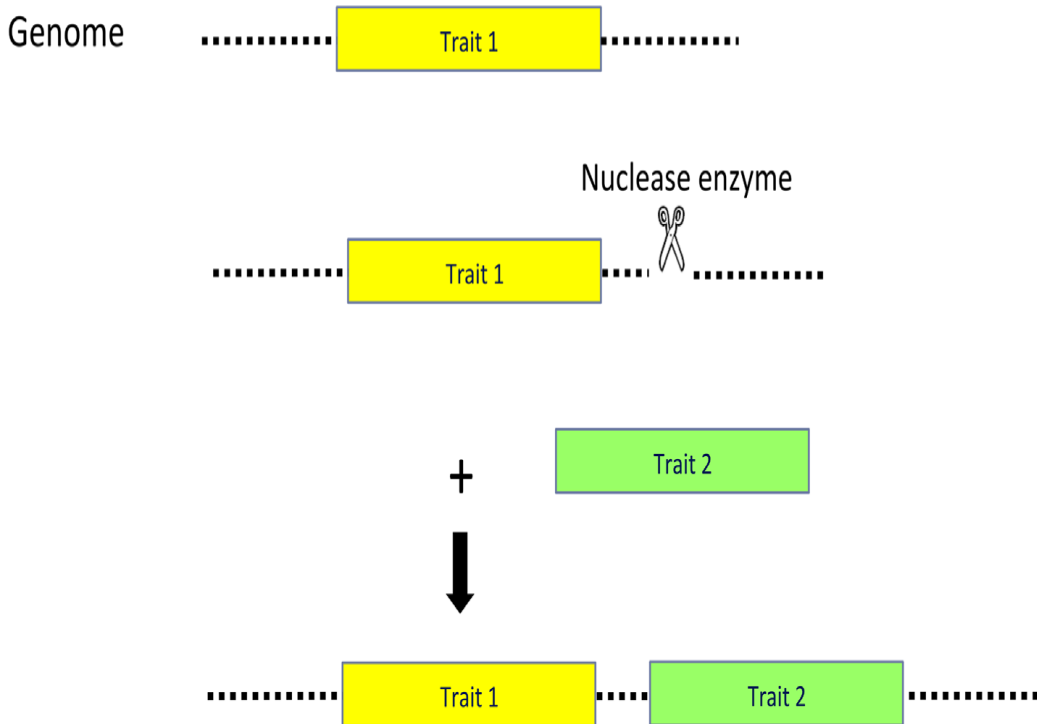
- Adiția țintită a unor gene care conferă noi funcții (de exemplu, toleranță la secetă)
- Inactivarea unor gene care afectează negativ calitatea hranei (de exemplu, codifică sinteza unor alergeni) sau conferă sensibilitate la boli
- Introducerea unor transgene în locuri care asigură niveluri înalte ale transcripției și permit evitarea interferenței cu activitățile genelor endogene
- Adiția mai multor gene în vecinătatea unui locus transgenic existent (risc redus de segregare)
- Corectarea genelor defective prin modificarea câtorva nucleotide, fără adăugare de ADN străin, ceea ce permite ca planta să nu fie clasificată ca OMG

## Utilizarea NSS:

**accelerează procesul de ameliorare prin modificări directe, precise și predictibile, ale germoplasmei elită și prin modificarea simultană a mai multor caractere;**

**permite evitarea intrării sub incidența reglementărilor care au în vedere eventualele efecte nedorite asociate integrării la întâmplare a transgenelor.**

# Cumularea țintită a mai multor caractere (gene stacking) Int. J. Dev. Biol. 57: 621-627 (2013)



- Nucleazele Situs Specifice permit cumularea mai multor gene în vecinătatea unui locus transgenic. Prin metode clasice și chiar prin transgeneză, este greu de realizat introducerea mai multor caractere cu risc minim de segregare
- Tot ansamblul genelor introduse poate fi ulterior mobilizat, prin încrucișare, în altă germoplasmă, deoarece se comportă ca un singur locus.
- Folosirea pentru cumularea genelor a nucleazelor programabile combinate cu recombinarea omoloagă sau neomoloagă evită rămânerea unor amprente în genom.

e.g. Herbicide tolerance and Insect Resistance



# Este necesară revizuirea legislației

- Editarea genomului face posibilă modificarea rapidă și precisă a plantelor de cultură în scopul creșterii producțiilor, protejării împotriva bolilor și dăunătorilor și sporirii conținutului nutritiv. Măsura în care aceste noi tehnologii vor fi valorificate în ameliorarea plantelor va depinde de modul în care Uniunea Europeană va decide reglementarea lor.

**NATURE PLANTS | VOL 1 | JANUARY 2015 |**

- Dacă modul în care UE reglementează biotehnologia nu se schimbă în pas cu acumularea cunoștințelor despre genomul plantelor, Europa va continua să rămână în urma restului lumii în privința transferului progreselor științei în ameliorarea modernă a plantelor.





# Precise plant breeding using new genome editing techniques: opportunities, safety and regulation in the EU

The Plant Journal [Volume 78, Issue 5](#), pages 742–752, June 2014

- “Poate fi demonstrat științific faptul că plantele obținute prin aplicarea noilor tehnici de ameliorare nu pot fi îndotdeauna deosebite de cele create prin tehnici convenționale. Prin urmare, este de așteptat ca riscurile pentru mediu și sănătate să nu fie mai mari în cazul utilizării acestor plante decât în cazul folosirii plantelor obținute prin metode clasice de ameliorare.
- În lumina dezbaterilor referitoare la modul în care vor fi reglementate noile tehnici și a dovezilor acumulate în privința siguranței PMG care au fost deja comercializate, plante care au făcut, pretutindeni în lume, obiectele unor studii ale eventualelor riscuri asociate utilizării lor, se poate sugera că plantele modificate prin noile tehnologii de ameliorare ar putea să fie evaluate pe baza noilor lor însușiri și nu în funcție de tehnica folosită pentru crearea lor”.



# Bibliografie selectivă

- The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing beyond. *Biotechnology Advances* 33 (2015) 41–52
- Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant Methods* 2013, 9:39
- Transgenic or not? No simple answer! New biotechnology-based plant breeding techniques and the regulatory landscape *EMBO reports* 13 |12, 2012
- New plant breeding techniques State-of-the-art and prospects for commercial development. European Commission's Joint Research Centre (JRC) Institute for Prospective Technological Studies (IPTS) in cooperation with the JRC Institute for Health and Consumer Protection (IHCP). 2011
- Nuclease-mediated genome editing: At the front-line of functional genomics technology. *Develop. Growth Differ.* (2014) 56, 2–13
- Biotechnology and biological sciences research council. New techniques for genetic crop improvement. Position statement  
disponibil: [www.sciencemediacentre.org/genome-editing](http://www.sciencemediacentre.org/genome-editing)
- Precision Genome Engineering and Agriculture: Opportunities and Regulatory Challenges (*PLOS Biology*, 2014)
- Plant Genome Engineering with Sequence-Specific Nucleases (*Annual Review of Plant Biology*, 2013)
- Regulatory uncertainty over genome editing. *NATURE PLANTS* | 1 | 2015 |
- Genome Engineering of Crops with Designer Nucleases. *The Plant Genome* 2012, 5, 2