유전자교정작물 내 비의도적 돌연변이의 안전성 논란에 관한 과학적 고찰

이신우 · 김윤희

Scientific considerations for the biosafety of the off-target effects of gene editing in crops

Shin-Woo Lee · Yun-Hee Kim

Received: 18 June 2020 / Revised: 23 July 2020 / Accepted: 3 August 2020

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract The number of commercially approved gene-edited crops is gradually increasing, and in South Korea, it has led to intense investment in gene-edited crop development to increase international competitiveness. However, as with genetically modified crops, the safety of gene-edited crops regarding unexpected risks for humans and the environment is subject to an ongoing debate. In particular, unintentional “off-target effects” have become the center of controversy. In this review, we discuss typical plant characteristics (including somatic variation and ploidy), the extent of various off-target effects in genetically modified crops generated via horizontal transfer in nature, and the off-target effects in commercial genetically modified crops. We conclude that most off-target effects possibly occurring in gene-edited crops are not expected to be critically harmful to humans or the environment. Therefore, existing regulation for genetically modified crops should be enough for the risk assessment of gene-edited crops.

Keywords Gene-editing, Gene-edited crop, Genetically modified crop, Off-target effects, Safety

S.-W. Lee
국립경남과학기술대학교 생명과학대학 농학·한약자원학부
(Department of Agronomy & Medicinal Plant Resources,
Gyeongnam National University of Science & Technology,
Jinju, Korea)

Y.-H. Kim (✉)
국립경상대학교 사범대학 생물교육과(농업생명과학연구원)
(Department of Biology Education, College of Education, IALS,
Gyeongsang National University, Jinju, Korea)
e-mail: cefle@gnu.ac.kr

서론

2018년 한 해 동안에 전 세계 GM 대두의 재배면적은 non-GM 대두를 포함한 전체 대두 재배면적의 78%, GM 면화는 76%, GM 옥수수는 30%, GM 유채가 29%로 해마다 증가하는 추세에 있다(ISAAA, 2019; 한국바이오안전성정보센터, <http://www.biosafety.or.kr/>). 1980년대에 GM 작물의 상업화가 승인된 이후 지금까지 GM 작물의 인체 및 환경에 대한 안전성 논란이 끊임없이 제기되어 왔음에도 불구하고 GM 작물의 재배면적은 이처럼 꾸준히 증가하고 있다. GM 작물에 관한 안전성 논란은 크게 두 가지로 요약된다. 첫째, 도입하고자 하는 외래 유전자 및 이를 도입하기 위하여 사용한 운반체 DNA 단편이 숙주 식물 세포의 유전체 내에 잔존 하여 새로운 형질을 발현하거나 내재하는 유전자의 발현에 관여하여 비의도적인 새로운 형질이 발현되는 경우로서 특히 바이러스 유래 프로모터(예, CaMV, TMV 등)가 유전체 내에 삽입되는 경우이다. 둘째, 외래유전자가 숙주 식물의 유전체 내 삽입 과정에 내재하는 유전자의 파괴, 염기의 삽입, 결실, 역위, 재배열 등에 의하여 의도하지 않은 새로운 특성이 나타나게 되는 경우이다(Jones 2015; Lee 2011).

최근에 급속도로 발전하고 있는 유전자교정기술은 인위적으로 제작된 핵산가수분해효소(nuclease)를 사용하여 특정 DNA 단편 내 염기서열을 정확하게 절단할 수 있다. 특히, 아그로박테리아를 매개로 하여 guide RNA나 Cas 9과 같은 효소를 암호화하는 유전자를 도입하기 위한 운반체를 도입하지 않고 사전에 시험관에서 준비한 Cas 9 단백질과 guide RNA ribonucleoproteins를 직접 식물 원형질체나 세포에 주입하는 방법을 사용하여 외래 DNA를 전혀 도입할 필요가 없는 기술도 개발되었다(Woo et al. 2015). 뿐만 아니라, 공여체 DNA(donor DNA)를 사용하지 않고도 정확하게 목표로 하는 숙주 유전체의 DNA 단편 내에 단 몇 개의 염기 삽입 또는 결실 등

을 유도할 수 있다. 따라서 최종적으로 완성된 유전자교정 작물의 유전체 내에 외래 DNA 단편이 잔존하지 않게 할 수 있다. 이렇게 제작된 유전자교정작물(site-directed nuclease, SDN-1)은 기존의 GM 작물에 대하여 잔존하는 외래 DNA 단편에 관한 안전성 논란은 완전히 해소한 기술이라고 할 수 있다(Hilscher et al. 2017; Lee 2019). 최근 미국 등을 중심으로 이러한 SDN-1 작물들의 상업화 승인은 빠르게 증가하는 추세에 있다(Lee 2018; Wolt et al. 2016). 그러나 유전자교정을 위하여 가이드 RNA 발현용 운반체 등의 도입, 목표유전자에 대한 유전자교정의 유기, 식물 조직배양, 선발 등의 전반적인 과정에서 의도하지 않은 비의도적 돌연변이(off-target)가 출현할 수 있다는 두 번째 논란은 아직 완전히 해결되지 못하고 있다.

현재 가장 많이 이용되고 있는 유전자교정기술인 CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) 시스템은 단일 가닥의 가이드 RNA (single guide RNA, sgRNA)와 목표 DNA 단편을 절단하는 Cas9 등의 가수분해효소 등으로 구성되어 있다. Cas9 등의 가수분해효소는 CRISPR RNA (crRNA)에 상보적인 가닥을 절단하는 NHN 도메인과 이중 나선 DNA의 다른 가닥을 절단하는 Ruc-V-like 도메인으로 구분한다. sgRNA는 5'말단에 목표 염기서열을 인식하는데 가장 중요한 염기서열을 포함하고 있다. 현재까지 보고된 바에 의하면 대부분의 비의도적 돌연변이(off-target)는 이 주변 즉 protospacer adjacent motif (PAM) 서열에서 집중적으로 확인되었다(Hsu et al. 2013; Mali et al. 2013). 이러한 비의도적 돌연변이를 낮추는 전략으로 가이드 sgRNA의 길이와 비 상보적인 mismatching 염기의 수, sgRNA의 GC함량 등이 주요한 인자인 것으로 보고되었다(Feng et al. 2014; Peterson et al. 2016; Zhou et al. 2014). 또한, sgRNA/Cas9 등의 가수분해효소 단백질의 농도 및 비율도 주요한 영향 인자로 작용하므로 이들을 도입하여 발현시키는 프로모터의 선정 등을 고려하여 비의도적 돌연변이의 빈도를 줄일 수 있는 조건을 설정할 필요가 있다(Jia and Wang 2014). 이 외에도 sgRNA 및 Cas9 등의 핵산 가수분해효소의 발현용 운반체의 도입을 위한 식물형질전환 방법, 다양한 Cas 변이체의 사용 등의 방법들도 제시되고 있다(Hajiahmadi et al. 2019; Lee et al. 2019). 또한 aptazyme (ribozyme-based sgRNA strategy, 자가 절단 RNA 효소)시스템의 적용 등도 제시되었다(He et al. 2017). 그러나 비의도적 돌연변이가 전혀 일어나지 않고 의도적 돌연변이(유전자 교정)만 100% 보장할 수 있는 기술의 개발이 쉽지 않은 것이 현실이다.

이러한 현실에도 불구하고 유전자교정 작물의 안전성 평가를 위하여 숙주 생물체의 유전체 내에 비의도적 돌연변이가 발생하지 않았다는 사실을 증명하는 자료를 제출하도록 하여야 한다는 주장이 제기되고 있다(Agapito-Tenfen et al. 2018). 그러나 이 또한 현실적으로 쉽지 않다. 특정 유전자교정 작물의 비의도적 돌연변이를 검정하기 위한 가장 확실한

방법은 전체 유전체의 염기서열을 분석하는 기술(whole genome sequencing, WGS)이다. 하지만 식물의 경우에는 유전자교정을 위한 식물조직배양 과정에서 일어나는 체세포 돌연변이 등에 대한 비교 실험이 동시에 수반되어야 정확하게 실제 비의도적 돌연변이 여부를 파악할 수 있다는 어려움이 지적되었다(Tang et al. 2018).

특히, 최근에 자연 상태에서 자연적으로 아그로박테리아의 T-DNA 단편이 식물체의 유전체에 삽입되어 현존하는 재배종까지 확인된 자연적으로 발생된 GM 고구마(Kyndt et al. 2015; Quispe-Huamanquis et al. 2019), 담배(Chen et al. 2014; 2016) 등의 연구결과에서도 T-DNA의 전이 과정에서 숙주 식물의 유전체에 내재하는 유전자 뿐만 아니라 도입되는 T-DNA 단편 내에 삽입, 결실, 역위, 재배열 등 다양한 형태의 돌연변이가 발생하였음이 확인되었으나 이들이 인체 및 환경에 대한 위해성이 확인된 보고는 없다. 또한, 현재까지 안전성 평가 후 상업화가 승인된 다수의 GM 작물의 이벤트 중에서도 목표로 하는 외래 유전자가 삽입된 재조합 T-DNA가 숙주 식물의 유전체 내로 전이되는 과정에서 야기된 비의도적인 염기의 결실, 삽입 등 크고 작은 돌연변이가 발생한 것을 알 수 있었다(Windels et al. 2001).

따라서 본 논문에서는 유전자교정 작물의 비의도적 돌연변이의 안전성에 관하여 식물이 내포하고 있는 특성에 따른 장점을 검토하고, 자연 상태에서 자연적으로 발생하여 재배종화된 GM 작물들과 현재까지 안전성 심사결과 상업화가 승인된 유전자변형작물 이벤트 중 비의도적 돌연변이가 발생한 사례들을 조사하여 인체 및 안전성에 미칠 잠재적인 위해성 여부 등을 검토하였다.

유전자교정식물에서의 비의도적 돌연변이 사례

Wolt 등(2016)이 발표한 연구내용에 따르면 2013년도에서 2016년도까지 발표된 15건의 유전자교정식물 중 비의도적 돌연변이가 확인되었다고 발표된 경우는 5건이었다. 이들은 목표 염기서열(Shan et al. 2013), seed 염기서열 또는 PAM 영역 주변(Endo et al. 2014; Xie and Young. 2013; Zhang et al. 2014) 및 기타의 경우 (Jacobs et al. 2015)에서 확인되었다. 이 외에도 콩(Li et al. 2015), 보리와 유채(Lawrenson et al. 2015), 애기장대(Zhang et al. 2018)를 대상으로 한 유전자 교정 실험에서 목표유전자와 PAM영역 주변에 다양한 결실 및 삽입 형태의 비의도적 돌연변이 사례가 보고되었다. 이들 대부분은 목표 유전자 내 단 몇 개의 염기 돌연변이를 유발하는 SDN-1 식물에 해당한다. 그러나 외부에서 공여 DNA를 도입하여 상동재조합기작으로 특정 유전자 단편을 도입하여 제작하는 SDN-2, SDN-3식물의 경우에는 이러한 비의도적 돌연변이의 빈도나 다양성이 증가할 것으로 예상된다. 또한, 상기한 연구 결과는 전체 유전체의 염기서열을 비교 분석하지 않고, 목표로 하는 염기서열과 운반체의 주변 그리고 비

의도적 돌연변이가 일어날 가능성이 있는 후보 영역에만 한정하여 확인한 결과이다.

최근 몇 년 동안, 비의도적돌연변이 빈도를 최소화 하기 위한 다양한 기술과 NGS 등의 염기서열 분석 기술들의 발달로 유전자교정식물의 전체 유전체의 염기서열을 비교 분석한 결과들이 지속적으로 증가하고 있다. Tang 등(2018)은 Cas9을 이용하여 만든 34계통과 Cpf1을 사용하여 만든 15계통의 유전자교정 벼의 T₀와 T₁세대에 대하여 전체 유전체의 염기서열 분석을 수행하여 대조구인 일반 벼(비유전자교정 벼)와 비교 분석한 결과 약 102~148개의 단일염기변이와 32~83건의 염기 삽입 및 결실이 조사되었으나 이들은 모두 유전자교정식물을 제작하기 위한 조직배양과정 등에서 발생하는 체세포 돌연변이에 해당하며 실제 비의도적돌연변이로 확인된 경우는 단 한 건에 불과하였다. 이 경우에도 컴퓨터 프로그램에 의하여 비의도적 돌연변이가 발생할 가능성이 이미 예견된 후보 guide RNA를 사용한 경우에 한정된 것으로 조사되었다. 또한, Li 등(2019)이 발표한 면화를 대상으로 한 연구에서도 대조 구인 일반 면화 계통과 전체 유전체 분석결과를 비교한 결과 대부분의 돌연변이는 조직배양 과정이나 기존의 모본으로부터 유래 되었다는 결론을 얻었다. 실제로 유전자교정과정에서 일어난 비의도적 돌연변이는 단지 4건이 확인되었으나 이들도 역시 컴퓨터프로그램에 의하여 비의도적 돌연변이의 발생 가능성이 예견된 guide RNA 또는 PAM을 사용한 경우에 해당하였다. Young 등 (2019)도 옥수수를 대상으로 동일한 연구결과를 발표하여 사전에 guide RNA를 어떻게 디자인 할 것인가가 무엇보다도 중요하다는 사실을 강조하였다.

유전자교정기술의 적용에 있어 식물이 내포하고 있는 장점 및 특성

식물의 가장 큰 장점 중 하나는 유전자교정 이후 선발과 육종과정에서 비의도적 돌연변이로 표현형이 모본과 확연하게 다를 경우 제거가 쉽다는 사실이다. 또한, 인류의 역사와 함께 발전하여 온 전통 교배 육종기술은 표현형으로 확인이 잘 안 되는 작은 규모의 비의도적 돌연변이가 일어난 경우에도 후대의 역 교잡(back cross) 등으로 비의도적 돌연변이가 일어난 영역이 제거된 계통의 선발도 부분적으로 가능하다(Hahn and Nekrasov 2019). 또한, 식물의 배수성은 식물이 갖는 또 다른 하나의 큰 장점이다. 밀, 고구마, 감자 등과 같은 3배체 이상의 배수체인 경우에 모든 상동염색체 내 동일한 위치에 정확하게 비의도적 돌연변이가 일어나는 경우가 드물며 나머지 정상적인 염색체에 의하여 실제로 표현형에는 큰 변화가 없는 경우가 대부분이다(Liang et al. 2017).

식물은 자연 상태에서 다양한 체세포 돌연변이가 빈번하게 일어나며, 대부분은 인체 및 환경에 미칠 잠재적인 위해성과는 거리가 멀다. 이러한 체세포 돌연변이는 아그로박테

리아 등의 기존 기술을 사용하거나 유전자교정기술을 도입하는 과정 중의 하나인 식물조직 배양 등의 과정에서도 빈번하게 일어날 수 있다. 따라서 이들 모든 체세포 돌연변이 현상을 비의도적 돌연변이로 규정하고 안전성 평가를 하여야만 하는가에 대한 과학적인 검토가 필요하다. 즉 전체 유전체 염기서열분석 기술을 이용하여 특정 유전자교정 작물에 대한 비의도적 돌연변이의 발생 여부를 확인하고 이들에 대한 안전성 평가를 수행하기 위하여서는 먼저 이들 비의도적 돌연변이가 자연 상태에서도 발생할 수 있는 것인가 아니면 유전자교정 작물의 개발과정에 의하여 발생한 것인가에 대한 대조 구의 선정 등에 의한 비교실험이 선행되어야 한다는 주장이 제기되었다(Hahn and Nekrasov 2019; Tang et al. 2018).

자연 상태에서 자생적으로 발생한 유전자변형식물이 재배종으로 된 사례

아그로박테리아의 T-DNA 단편이 자연 상태에서 식물체의 유전체 내에 전이된 사례는 담배에서 최초로 보고되었다(Furner et al. 1986; White et al. 1983). *Nicoiana glauca* 종을 포함하여 *N. tomentosiformis*, *N. kawakami*, *N. tabacum*, *N. tomentosa*, *N. otophora* 등 42종의 다양한 담배 계통에서 T-DNA의 단편이 확인되었다(Aoki 2004; Aoki and Syono 1999; Aoki et al. 1994; Intrieri and Buiatti 2001). 이들 단편에 대하여 전체 유전체 염기서열 분석 및 chromosome walking 분석 등의 기술을 통하여 담배에 전이된 T-DNA는 *A. rhizogenes*의 mikimopine-type Ri plasmid (pRi) 단편으로 밝혀졌다(Table 1). 이들 삽입된 T-DNA 단편에 대한 염기서열 분석 등의 연구결과를 종합하여 본 결과, Table 1에서 요약한 바와 같이, *N. glauca*, *N. tomentosiformis*, *N. kawakami*는 각각 TA, TB, TC, TD로 명명된 T-DNA 단편 들이 삽입된 것으로 확인되었다. TA 단편은 *orf3-orf8-rolA-rolB-rolC-orf13-orf14-mis*, TB는 *orf14-mis*와 *ags-mas1'-mas2'*, TC는 *orf2-orf3-orf8-rolA-rolB*, *ocl*과 *c*, TD는 *orf15*, *orf511*와 *orf14* 유전자로 구성되었다. 반면에, *N. tabacum*는 이들 4개 단편 중 TC가 그리고 *N. tomentosa*는 TA 단편이 삭제되었으며, *N. otophora*는 단지 TC 단편만이 확인되었으며, 불완전 역반복(incomplete inverted repeat)형태로 삽입되어 있는 것으로 확인이 되었다(Chen et al. 2014, 2016; Mohajjel-Shoja et al. 2011; Suzuki et al. 2002). 이러한 복잡한 삽입 형태를 종합하여 Chen 등(2014; 2016)은 이들 T-DNA 단편 내 유전자들은 현존하는 재배종 담배의 먼 조상 계통에 개별적으로 전이된 다음 오랜 세월을 거치는 육종과정에서 T-DNA 단편 내 존재하는 식물호르몬(예, mannopine synthase)의 생산과 관련된 유전자들의 발현으로 선발이 쉽게 되어 선택적으로 현재의 재배종까지 존재하게 되었다고 추론하였다. 실제로 opine을 생산하는 유전자인 *TB-mas2'*의 뿌리 조직 내 발현으로 인하여 opine 호르몬이 생산되는 것을 확인하였다(Chen and Otten 2017). 그러나 초기에 보고된 연구결과에 의하면

Table 1 자연적으로 창출된 유전자변형작물 사례

작물	종	전이된 유전자	참고문헌
담배	<i>N. glauca</i>	<i>TA, TB, TC, TD</i> ¹⁾	White et al. 1983 Aoki et al. 1994 Suzuki et al. 2002
	<i>N. tomentosiformis</i> <i>N. kawakamii</i>	<i>TA, TB, TC, TD</i>	Chen et al. 2014 Chen et al. 2016
	<i>N. tabacum</i>	<i>TA, TB, TD</i>	Fründt et al. 1998 Mohajjel-Shoja et al. 2011 Chen et al. 2016
	<i>N. tomentosa</i>	<i>TB, TC, TD</i>	Chen et al. 2014; 2016
	<i>N. otophora</i>	<i>TC</i>	Chen et al. 2014
	<i>I. cordatotriloba</i> <i>I. tenuissima</i>	<i>IbTDNA1</i> ²⁾	Kyndt et al. 2015 Quispe-Huamanquis et al. 2019
고구마	<i>I. trifida</i>	<i>IbTDNA2</i> ³⁾	Kyndt et al. 2015 Quispe-Huamanquis et al. 2019
	<i>I. batatas</i> [L.] Lam 재배종	<i>IbTDNA1, IbTDNA2</i>	Kyndt et al. 2015
리나리아	<i>L. vulgaris</i>	<i>LvORF2, LvORF3,</i> <i>LvORF8, LvrolA,</i> <i>LvrolB, LvrolC,</i> <i>LvORF13, LvORF14,</i> <i>Lvmis</i>	Matveeva et al. 2012 Pavlova et al. 2014
	<i>L. acutiloba</i>	<i>rol C</i>	Matveeva and Kosachev 2013
	<i>L. dalmatica</i>	<i>rol C</i>	Pavola et al. 2013; 2014

¹⁾*TA, orf3-orf8-rolA-rolB-rolC-rolF13-orf14-mis; TB, orf14-mis and ags-mas1'-mas2'; TC, orf2-orf3-orf8-rolA-rolB, ocl and c; TD, orf15, orf511 and orf14.*

²⁾*IbTDNA1, iaaM, iaaH, C-prot, Acs*

³⁾*IbTDNA2, ORF14, ORF17n, rooting locus (Rol)B/RolC, ORF13, ORF18/ORF17n*

담배 식물체에 전이된 T-DNA 내 유전자들의 발현이 아주 미미하여(Aoki and Syono 1999; Costantino et al. 1994), 식물의 성장에 뚜렷하게 영향을 미칠만한 수준이 아니라고 보고되었다(Chen et al. 2014; Lemcke and Schmölling 1998). 따라서 이들 전이 유전자들의 발현 여부에 관한 결론은 아직 추가적인 연구가 보장되어야 한다고 사료 된다. Kovacova 등(2014)은 담배의 유전체에 전이된 T-DNA 단편 내에 포함된 mikimopine 합성효소를 암호화하는 *mis* 유전자의 구조 및 발현 여부를 조사한 결과 이 유전자는 틀 이동 돌연변이(frameshift)가 일어나 해당 전사체 내에 여러 개의 조기 종결코돈의 발생으로 정상적인 기능을 갖춘 단백질이 번역될 수 없다는 사실을 확인하였다. 따라서 아마도 이들 전사체가 small interference RNA (siRNA)에 의한 RNA 간섭현상 등으로 전사 후 조절 기능에 관여할 것이라고 추론하였다. 향후 이러한 사실이 증명된다면 자연적으로 T-DNA가 전이된 담배 등의 계통이 어떻게 오랜 세월 동안 후대를 거치면서 선발이 되어 현재의 재배종에까지 유지되고 보존될 수 있었는지에 대한 단서를 제공할 수 있을 것으로 사료 된다.

Kyndt 등(2015)은 6배체의 재배종 고구마(*Ipomoea batatas* [L.] Lam.)의 siRNA에 관한 metagenome 분석을 통하여 아그

로박테리아의 T-DNA 단편들을 확인하였으며, 이들을 각각 IbT-DNA1과 IbT-DNA2로 명명하였다(Table 1). 이들 역시 자연 상태에서 고구마의 유전체에 전이되어 삽입된 경우로 전 세계로부터 수집한 고구마의 재배종, 야생종, 가까운 근연종들에 대한 분석을 수행한 결과 현재 고구마 재배종의 기원종을 추론할 수 있는 흥미로운 연구결과를 발표하였다. 고구마의 재배종에 해당하는 6배체인 *I. batatas* [L.] Lam의 유전체에는 IbT-DNA1과 IbT-DNA2 모두가 삽입된 것을 확인하였으나 *I. batatas* [L.] Lam과 가장 가까운 근연종으로 현재까지 고구마 재배종의 기원종으로 추정되어 온 2배체 *I. trifida*의 유전체에는 IbT-DNA2 단편만 확인되었으며, 다른 야생종 그룹인 *I. cordatotriloba*와 *I. tenuissima*의 유전체에는 IbT-DNA1만이 삽입된 것을 확인하였다. 따라서 이러한 연구결과를 바탕으로 재배종인 6배체 고구마의 기원종에 대한 분자생물학적 추적이 가능할 것이라고 할 수 있다. 특히, 6배체인 재배종에 삽입된 T-DNA 단편의 위치가 이들 야생종에 삽입된 위치와 일치하였으며 유전자들의 순서도 거의 일치하는 것을 확인할 수 있었다(Matveeva, 2018; Quispe-Huamanquis et al. 2017).

*I. cordatotriloba*와 *I. tenuissima*의 유전체에 삽입된 것으로

확인된 IbT-DNA1은 tryptophan-2-monooxygenase (*iaaM*), indole-3-acetamide hydrolase (*iaaH*), C-protein (*C-prot*), agrociniopine synthase (*Acs*) 4종류의 단백질을 암호화 하는 유전자를 포함하는 것으로 확인되었다. 반면에 IbT-DNA2는 *ORF14*, *ORF17n*, rooting locus (*Rol*)*B/RolC*, *ORF13*, *ORF18/ORF17n* 등 적어도 5 종류의 open reading frames (ORF)를 포함하는 것으로 확인되었다(Kyndt et al. 2015). IbT-DNA1 단편은 고구마 유전체의 F-box 유전자의 3번 인트론 영역에 삽입되어 유전자의 발현을 방해할 것으로 생각되나 6배체 중 다른 2개의 상동염색체에는 삽입이 되지 않아 정상적인 것으로 확인되어 F-box 단백질의 기능에는 문제가 없는 것으로 확인되었다. 또한, IbT-DNA1 단편 내에 포함된 유전자들 즉 *iaaM*, *iaaH*, *C-prot*, *Acs* 등은 잎, 줄기, 뿌리, 정단 조직, 저장조직 등 거의 모든 조직에서 발현되고 있음을 확인하였다(Kyndt et al. 2015). IbT-DNA2는 7번 염색체에 존재하는 미토콘드리아의 기질운반체군(mitochondria substrate carrier family)에 속하는 단백질을 암호화 하는 *UcpB* 유전자의 인트론에 삽입된 것으로 확인되었으며, 삽입과정에서 7번과 8번 인트론 사이에 삽입되면서 8번 엑손을 포함한 893 bp가 결실 되었음을 확인하였다. IbT-DNA2에 포함된 것으로 확인된 rooting locus (*RolB/RolC*) 등 다른 ORF 유전자에 대한 전사체를 확인한 결과, 역시 이들이 발현되고 있음을 확인하였다(Matveeva 2018; Quispe-Huamanquispe et al. 2017). 저자들은 현재 전 세계적으로 재배되고 있는 거의 모든 고구마 재배종에 이들 T-DNA 단편이 전이된 것을 확인하여 이들 단편 내 포함된 유전자들의 발현으로 인하여 나타나는 농업적 특성, 특히 저장조직인 뿌리의 수확량 증대 등이 이들 재배종의 육종 및 선발 과정에 유리하게 작용하였을 것이라고 추론하고 있다.

해란초 속에 속하는 *Linaria vulgaris*, *L. acutiloba*, *L. dalmatica* 등에서도 자연생태에서 T-DNA 단편이 전이된 것이 확인되었다(Table 1). 흥미로운 사실은 앞서 언급한 역반복으로 전이된 담배와는 달리 *L. vulgaris*의 유전체에는 2개의 사본의 T-DNA 단편이 정방향으로 반복 배열되어 있으며 유전자는 *LvORF2*, *LvORF3*, *LvORF8*, *LvrolA*, *LvrolB*, *LvrolC*, *LvORF13*, *LvORF14*, *Lvmis* 등으로 확인되었다(Matveeva et al. 2012; Matveeva and Kosachev 2013; Matveeva and Lutova 2014). *L. acutiloba*와 *L. dalmatica* 에서도 적어도 *rol C* 유전자의 삽입이 확인되었으며, 뿌리발달에 관여하는 *rol C* 유전자가 이들 식물체에서 어떤 기능을 하는지에 관한 추가연구가 필요하다고 할 수 있다(Pavola et al. 2013, 2014). 이 외에도 당근 (*Daucus carota*) (Spano et al. 1982), carpet bugleweed (*Ajuga reptans*) (Tanaka 2008) 등의 식물에서도 T-DNA 단편의 존재를 확인한 바 있으나 염기서열 분석 등을 통한 정확한 삽입 위치나 전이된 유전자의 특성 등은 아직 보고되지 않았다. 이렇게 자연적으로 식물체의 유전체에 전이된 T-DNA는 생물적, 무생물적 환경 스트레스에 대한 저항성을 증가시키거나 타감작용(allelopathic effect), 식물과 미생물의 공생 관계

(symbiotic relationship) 증진 등으로 상대적으로 선택압이 증가하여 오랜 세월을 지나면서 현재의 재배종까지 유지된 것으로 추론 되고 있다(Kovacova et al. 2014).

상업화가 승인된 유전자변형작물의 비의도적인 돌연변이 사례

유전자교정기술이 실용화되기 전에는 주로 아그로박테리아 감염법을 이용하여 유전자변형작물을 만들었다. 이는 자연 상태에서 일어나는 유전자의 수평 전이(horizontal transfer) 기작을 이용한 것으로 아그로박테리아에서 전이되는 T-DNA 단편에 원하는 유용유전자를 삽입하여 만든 재조합 T-DNA 단편을 식물에 전이가 되도록 하였다. 그러나 T-DNA의 전이 및 삽입은 숙주 식물 유전체 내의 어느 특정 위치에만 삽입되는 것이 아니라 무작위적인 과정이며, 삽입을 위한 이중나선의 절단 및 교정 과정에서 삽입되는 T-DNA의 양쪽 말단 뿐만 아니라 숙주 유전체 내의 삽입 경계면에 결실, 삽입, 재배열 등의 다양한 돌연변이가 일어날 수 있다(Salomon and Puchta 1998). 실제로 현재까지 안전성 평가를 거쳐 상업화가 승인된 이벤트 작물 중에서 다수의 비의도적 돌연변이가 확인 되었다(Table 2). 그러나 이러한 비의도적 돌연변이가 실제로 인체 및 환경에 어떠한 위해성을 미칠 것인가에 대한 안전성 평가는 엄격한 평가 규정에 따라 수행되었으며 현재까지 이러한 비의도적 돌연변이가 인체 및 환경에 미칠 어떠한 잠재적인 위해성은 아직 보고된 바가 없다. 이는 바로 식물이 내포하고 있는 장점에 기인한다고 할 수 있다.

상업화가 승인된 이벤트의 유전체에 재조합 T-DNA가 삽입되는 과정에서 일어난 비의도적인 돌연변이는 삽입, 결실, 염기치환, 염색체 재배열 등으로 재조합 T-DNA의 삽입 주변의 경계 면과 T-DNA 내 유전자의 재배열 등에 국한되었다(Table 2). 작물별로는 옥수수, 유채, 콩 등이었으며, 도입된 유전자들은 제초제 저항성, 해충 저항성이었다. Cry1(A)b 유전자가 도입된 MON 810 YieldGard® 옥수수는 도입된 T-DNA 단편 내 목표유전자의 발현을 위하여 부착한 NOS terminator 염기서열이 결실되어 이 부위를 지나서 보다 긴 전사체가 만들어지면서 2개에서 18개까지의 다른 아미노산이 추가된 ORF가 확인되었다(Rosati et al. 2008). 또한, MS11 유채, MON 89788, SYHT0H2 콩은 각각 T-DNA의 우측과 좌측 삽입 경계 면에 6 bp에서 61 bp의 결실이 있었으며, MON 87751 콩은 우측과 좌측에 각각 16개와 7개 염기의 결실과 함께 좌측에 1개의 염기가 삽입되었다. DP 305423-1 콩 이벤트는 ω -6 desaturase를 암호화 하는 콩 내재성 *fad2-1* 유전자의 399 ~ 995번 유전자 단편에 대한 역방향 유전자를 도입하여 유전자 침묵 현상을 유도하여 올레산 함량이 증가하고, 리놀레산 함량이 감소하도록 한 이벤트이다. 이 경우에도 우측 및 좌측 삽입 경계 면에 약 500 bp의 결실과 23개의 염기 치환 등이 확인되었다. 제초제 저항성 유전자와 해충 저항성 유전자가 도입된 DAS 59122-7 옥수수도 우측과 좌측 삽

Table 2 상업화가 승인된 유전자변형작물의 게놈 내 비의도적 돌연변이(off-target) 발생 사례

돌연변이	이벤트	도입유전자	특징	자료출처
삽입·결실	MON 810 YieldGard® 옥수수	<i>CryI(A)b</i>	NOS terminator 결실, 2-18개의 다른 아미노산 추가	Rosati et al. 2008
	MS 11 카놀라	<i>bar</i> , <i>barnase</i> , <i>barstar</i>	결실: 우측(26bp), 좌측(61bp) 삽입경계	한국바이오안전성정보센터 www.biosafety.or.kr
	MON89788 콩	<i>CP4EPSPS</i>	결실: 우측(10), 좌측(6) 삽입 경계	상동
	MON87751 콩	<i>cryIA.105</i> , <i>cry2Ab2</i>	결실: 우측(16), 좌측 (7) 삽입경계 삽입: 좌측(1) 경계	상동
	SYHT0H2 콩	<i>pat</i> , <i>avhppd-03</i>	결실: 좌측(7)삽입경계	상동
결실·염기치환	DP-305423-1 콩	<i>gm-fad2-1</i> <i>gm-hra</i>	결실: 우측 및 좌측 삽입 경계, 약 500 염기치환: 23	상동
	DAS 59122-7 옥수수	<i>pat</i> , <i>cry34Ab1</i> <i>cry35Ab1</i>	결실: 우측(22), 좌측(25) 염기치환: 2	상동
염색체 재배열	RoundUp Ready 40-3-2 콩	<i>CP4EPSPS</i>	도입유전자와 숙주 염색체 단편과의 염색체 재배열	Windels et al. 2001
	DAS-81419-2 콩	<i>cryIAc</i> , <i>cryIFv3</i> , <i>pat</i>	도입유전자의 재배열	한국바이오안전성정보센터 www.biosafety.or.kr

입 경계 면에서 각각 22개와 25개의 염기가 삽입되었으며 2개의 염기 치환도 확인되었다. 그리고 CP4EPSPS 유전자가 도입된 RoundUp Ready 40-3-2 콩은 도입유전자와 숙주 염색체 단편과의 일부 염색체 재배열도 확인되었으며, DAS-81419-2 콩은 도입 유전자 내 재배열이 일어난 것으로 확인되었다(Windels et al. 2001).

이러한 이벤트 내 비의도적 돌연변이에 대한 안전성은 삽입 유전자 및 인접하는 숙주 유전체의 유전자 내에 위치하는 외래전사해독프레임의 유무와 전사 및 단백질 번역 등의 유전자 발현 가능성 유무를 검토한 후, 내재 유전자 사이 접합부 및 T-DNA 결합으로 생성된 새로운 접합부에서 암호화되는 추정 상의 폴리펩타이드를 기존에 알려진 독소, 알레르겐, 위해성을 보이는 생물 활성 단백질과 생물 정보학적 방법으로 비교 분석하며, 동물을 이용한 장, 단기 임상시험을 통한 안전성 시험 결과로 최종적인 승인 여부를 결정한다.

이상의 검토 결과를 종합하여 보면 유전자교정 작물의 안전성 평가를 위한 규정은 최종적으로 생산된 산물을 규제하도록 하여야 하며, 유전자교정 기술 그 자체를 규제하도록 제정되어서는 안 된다고 생각한다(Carroll et al. 2016). 이러한 주장은 유전자교정 작물에서 확인되는 대부분의 비의도적 돌연변이는 인체 및 환경에 대한 잠재적인 위해성을 내포하고 있지 않으며 식물의 전통 교배육종에 의한 포장 육성과정에서도 자연적으로 발생하는 수준의 돌연변이이기 때문

이다. 또한, 비의도적 돌연변이의 영향으로 인하여 표현형이 모본과 확연하게 차이가 나거나 인체 및 환경에 대하여 비의도적인 위해성을 미칠 수 있는 계통들은 후대에 교배육종 과정을 통하여 대부분 제거가 가능하다. 따라서 유전자교정 작물의 비의도적 돌연변이 현상에 대한 안전성 평가는 기존의 유전자변형작물의 안전성 평가 기준에 따라 수행하면 충분하다고 사료 된다. 오히려 전통교배육종 기술로 육성한 계통과 구분이 어려운 SDN-1 그룹에 속하는 유전자교정 작물은 규제 대상에서 제외되어야 한다고 생각한다(Lee 2019).

적 요

최근, 유전자교정 작물의 상업화 승인 건수가 급속하게 늘어나고 있으며, 국내에서도 유전자교정 작물의 개발에 대한 집중적인 투자를 통하여 국제경쟁력을 높이기 위하여 노력하고 있다. 그러나 기존의 유전자변형작물의 상업화 과정에서 끊임없이 제기되어온 인체 및 환경에 대한 잠재적인 위해성 논란이 유전자교정 작물에 대하여서도 제기되고 있다. 특히, 비의도적 돌연변이(off-target)가 가장 큰 논란의 중심이 되고 있다. 따라서 본 리뷰는 식물이 내포하고 있는 장점인 배수체, 체세포 돌연변이 그리고 자연 상태에서 아그로

박테리아의 T-DNA 단편의 수평 전이로 창출된 자연적인 유전자변형작물과 기존에 상업화가 승인된 유전자변형작물 이벤트들의 게놈 내 비의도적 돌연변이 사례 등을 검토한 결과 유전자교정 작물에서 나타나는 대부분의 비의도적 돌연변이는 인제 및 환경에 미칠 수 있는 위해성을 우려할 만한 수준이 아니라고 할 수 있었다. 이에, 유전자교정 작물의 안전성 평가를 위하여 새로운 규정을 제정할 필요가 없으며 기존의 유전자변형작물의 안전 관리규정을 일부 “용어의 정의” 등만 개정하여 적용하면 충분할 것으로 사료 되었다.

사 사

본 연구는 2020년도 경남과학기술대학교 교원 연구활성화 지원 사업의 예산지원으로 수행되었음.

References

- Agapito-Tenfen AZ, Okoli AS, Bernstein MJ, Odd-Gunnar Wikmark O-G, Myhr AI (2018) Revisiting risk governance of GM plants: the need to consider new and emerging gene-editing techniques. *Front Plant Sci* 9:1874–1890
- Aoki S, Kawaoka A, Sekine M, Ichikawa T, Fujita T, Shinmyo A (1994) Sequence of the cellular T-DNA in the untransformed genome of *Nicotiana glauca* that is homologous to ORFs 13 and 14 of the Ri plasmid and analysis of its expression in genetic tumors of *N. glauca* x *N. langsdorffii*. *Mol Gen Genet* 243:706–710
- Aoki S, Syono K (1999) Horizontal gene transfer and mutation: ngrol genes in the genome of *Nicotiana glauca*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:13229–13234
- Aoki S (2004) Resurrection of an ancestral gene: Functional and evolutionary analyses of the Ngrol genes transferred from *Agrobacterium* to *Nicotiana*. *J Plant Res* 117:329–337
- Carroll D, Van Eenennaam AL, Taylor JF, Seger J, Voytas DF (2016) Regulate genome-edited products, not genome editing itself. *Nat Biotechnol* 34:477–479
- Chen K, Dorlhac de Borne F, Szegedi E, Otten L (2014) Deep sequencing of the ancestral tobacco species *Nicotiana tomentosiformis* reveals multiple T-DNA inserts and a complex evolutionary history of natural transformation in the genus *Nicotiana*. *Plant J* 80:669–682
- Chen K, Borne FD, Julio E, Obszynski J, Pale P, Otten L (2016) Roots specific expression of opine genes and opine accumulation in some cultivars of the naturally occurring genetically modified organism *Nicotiana tabacum*. *Plant J* 87:258–269
- Chen K, Otten L (2017) Natural *Agrobacterium* transformants: Recent results and some theoretical considerations. *Front Plant Sci* 8:1600–1616
- Costantino P, Capone I, Cardarelli M, De Paolis A, Mauro ML, Trovato M (1994) Bacterial plant oncogenes: the rol genes' saga. *Genetica* 94:203–211
- Endo M, Mikami M, Toki S (2014) Multigene knockout utilizing off-target mutations of the CRISPR/Cas9 system in rice. *Plant Cell Physiol* 56:41–47
- Feng Z, Mao Y, Xu N, Zhang B, Wei P, Yang DL, Wang Z, Zhang Z, Zheng R, Yang L (2014) Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:4632–4637
- Furner IJ, et al. (1986) An *Agrobacterium* transformation in the evolution of the genus *Nicotiana*. *Nature* 319:422–427
- Hajiahmadi Z, Shirzadian-Khorramabad R, Kazemzad M, Sohani MM (2019) Enhancement of tomato resistance to *Tuta absoluta* using a new efficient mesoporous silica nanoparticle-mediated plant transient gene expression approach. *Sci Hortic* 243:367–375
- Hahn F, Nekrasov V (2019) CRISPR/Cas precision: Do we need to worry about off-targeting in plants? *Plant Cell Rep* 38:437–441
- Hajiahmadi Z, Movahedi A, Wei H, Li D, Orooji Y, Ruan H, Zhuge Q (2019) Strategies to increase on-target and reduce off-target effects of the CRISPR/Cas9 system in plants. *Int J Mol Sci* 20:3719–3738
- He Y, Wang R, Dai X, Zhao Y (2017) On improving CRISPR for editing plant genes: Ribozyme-mediated guide RNA production and fluorescence-based technology for isolating transgene-free mutants generated by CRISPR. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, Volume 149, pp. 151–166
- Hilscher J, Burstmayr H, Stoger E (2017) Targeted modification of plant genomes for precision crop breeding. *Biotechnol J* 12:1–4
- Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, Li Y, Fine EJ, Wu X, Shalem O (2013) DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol* 31:827–832
- Intrieri MC, Buiatti M (2001) The horizontal transfer of *Agrobacterium rhizogenes* genes and the evolution of the genus *Nicotiana*. *Mol Phylogenet Evol* 20:100–110
- ISAAA brief 54 (2019) Executive Summary, Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2018
- Jacobs TB, LaFayette PR, Schmitz JR, Parrott WA (2015) Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9. *BMC Biotechnol* 15:16
- Jones HD (2015) Future of breeding by genome editing is in the hands of regulators. *GM Crops Food* 6:223–232
- Kovacova V, Zluvova J, Janousek B, Talianova M, Vyskot B (2014) The evolutionary fate of the horizontally transferred *Agrobacterium* mikimopine synthase gene in the genera *Nicotiana* and *Linaria*. *PLoS ONE* 9:e113872
- Kyndt T, Quispea D, Zhaic H, Jarret R, Ghislain M, Liu Q, Gheysen G, Kreuze JF (2015) The genome of cultivated sweetpotato contains *Agrobacterium* T-DNAs with expressed genes: an example of a naturally transgenic food crop. *Proc Natl Acad Sci USA* 112:5844–5849
- Lawrenson T, Shorinola O, Stacey N, Li C, Ostergaard L, Patron

- NJ, Uauy C, Harwood W (2015) Induction of targeted, heritable mutations in barley and *Brassica oleracea* using RNA-guided Cas9 nuclease. *Gen Biol* 30:258–271
- Lee K, Zhang Y, Kleinstiver BP, Guo JA, Aryee MJ, Miller J, Malzahn A, Zarecor S, Lawrence-Dill CJ, Joung JK (2019) Activities and specificities of CRISPR/Cas9 and Cas12a nucleases for targeted mutagenesis in maize. *Plant Biotechnol J* 17:362–372
- Lee SW (2011) Strategies for the development of GM crops in accordance with the environmental risk assessment (I). *J Plant Biotechnol* 38:1–5
- Lee SW (2018) Strengthening the competitiveness of agricultural biotechnology through practical application of gene editing technology. *J Plant Biotechnol* 45:135–170
- Lee SW (2019) Current status on the modification of the scope for GMO regulation on the gene edited plants with no remnants of inserted foreign DNA fragments. *J Plant Biotechnol* 46:137–142
- Lemcke K, Schmülling T (1998) Gain of function assays identify non-rol genes from *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA that alter plant morphogenesis or hormone sensitivity. *Plant J* 15:423–433
- Li Z, Liu Z, 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* 169:960–970
- Li J, Manghwar H, Sun L, Wang P, Wang G, Sheng H, Zhang J, Liu H, Qin L, Rui H, Li B, Lindsey K, Daniell H, Jin S, Zhang X (2019) Whole genome sequencing reveals rare off-target mutations and considerable inherent genetic or/and somaclonal variations in CRISPR/Cas9-edited cotton plants *Plant Biotechnol J* 17:858–868
- 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* 8:14261–14266
- Mali P, Aach J, Stranges PB, Esvelt KM, Moosburner M, Kosuri S, Yang L, Church GM (2013) CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat Biotechnol* 31:833–838
- Matveeva TV, Bogomaz DI, Pavlova OA, Nester EW, Lutova LA (2012) Horizontal gene transfer from genus *Agrobacterium* to the plant *Linaria* in nature. *Mol Plant Microbe Interact* 25:1542–1551
- Matveeva TV, Kosachev PA (2013) “Sequences homologous to *Agrobacterium rhizogenes* rolC In the genome of *Linaria acutiloba*,” in International Conference on Frontiers of Environment, Energy and Bioscience (ICFEEB 2013). (Lancaster, PA:DES tech Publications, Inc.), 541–546
- Matveeva TV, Lutova LA (2014) Horizontal gene transfer from *Agrobacterium* to plants. *Front Plant Sci* 5:1–11
- Matveeva TV (2018) *Agrobacterium*-mediated transformation in the evolution of plants. *Curr Top Microbiol Immunol* 418: 421–441
- Mohajjel-Shoja H, Clément B, Perot J, Alioua M, Otten L (2011) Biological activity of the *Agrobacterium rhizogenes*-derived *rolC* gene of *Nicotiana tabacum* and its functional relation to other plast genes. *Mol Plant-Microbe Interact* 24:44–53
- Pavlova OA, Matveeva TV, Lutova LA (2013) *Linaria dalmatica* genome contains a homologue of *rolC* gene of *Agrobacterium rhizogenes*. *Eco Genet* 11:10–15
- Pavlova O, Matveeva T, Lutova L (2014). Genome of *Linaria dalmatica* contains *Agrobacterium rhizogenes* *RolC* gene homolog. *Russ J Genet Appl Res* 4:461–465
- Peterson BA, Haak DC, Nishimura MT, Teixeira PJ, James SR, Dangel JL, Nimchuk ZL (2016) Genome-wide assessment of efficiency and specificity in CRISPR/Cas9 mediated multiple site targeting in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* 16:11, e0162169
- Quispe-Huamanquispe DG, Gheysen G, Kreuze JF (2017) Horizontal gene transfer contributes to plant evolution: The case of *Agrobacterium* T-DNAs. *Front Plant Sci* 8:2015–2021
- Quispe-Huamanquis DG, Gheysen G, Yang J, Jarret R, Rossel G, Kreuze JF (2019) The horizontal gene transfer of *Agrobacterium* T-DNAs into the series *Batatas* (Genus *Ipomoea*) genome is not confined to hexaploid sweetpotato. *Sci Rep* 9:12584–12597
- Rosati A, Bogani P, Santarlasci A, Buiatti M (2008) Characterisation of 3' transgene insertion site and derived mRNAs in MON810 YieldGard maize. *Plant Mol Biol* 67:271–281
- Salomon S, Puchta H (1998) Capture of genomic and T-DNA sequences during double-strand break repair in somatic plant cells. *EMBO J* 17:6086–6095
- Shan QY, Wang K, Chen Z, Liang J, Li Y, Zhang K, Zhang J, Liu DFV, Zheng X (2013) Rapid and efficient gene modification in rice and *Brachypodium* using TALENs. *Mol Plant* 6:1365–1368
- Spano L, Pompon M, Costantino P, van Slogteren GMS, Tempé J (1982) Identification of T-DNA in the root-inducing plasmid of the agropine type *Agrobacterium rhizogenes* 1855. *Plant Mol Biol* 1:291–304
- Suzuki K, Yamashita I, Tanaka N (2002) Tobacco plants were transformed by *Agrobacterium rhizogenes* infection during their evolution. *Plant J* 32:775–787
- Tanaka N (2008) Horizontal gene transfer in *Agrobacterium*: from Biology to Biotechnology, eds T. Tzfira and V. Citovsky (New York, NY: Springer), 623–647
- Tang X, Liu G, Zhou J Xu T, Ren Q, You Q, Tian L, Xin X, Zhong Z, Liu B, Zheng X, Zhang D, Malzahn A, Gong Z, Qi Y, Zhang T, Zhang Y (2018) A large-scale whole-genome sequencing analysis reveals highly specific genome editing by both Cas9 and Cpf1 (Cas12a) nucleases in rice. *Genome Biol* 19:84–101
- White FD, Garfinkel J, Huffman GA, Gordon MP, Nester EW (1983) Sequences homologous to *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA in the genomes of uninfected plants. *Nature* 301:348–350
- Windels P, Taverniers I, Depicker A, van Bockstaele E, De Loose M (2001) Characterisation of the roundup ready soybean insert. *Eur Food Res Technol* 213:107–112
- Wolt JD, Wang K, Sashital D, Lawrence-Dill CJ (2016) Achieving plant CRISPR targeting that limits off-target effects. *Plant Genome* 9: 1–8
- Woo J W, Kim J, Kwon S I, Corvalan C, Cho S W, Kim H, Kim S G, Kim S T, Choe S, Kim J S (2015)

- DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat Biotechnol* 33(11):1162–1164
- Xie K, Yang Y (2013) RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. *Mol Plant* 6:1975–1983
- Young J, Zastrow-Hayes G, Deschamps S, Svitashchev S, Zaremba M, Acharya A, Paulraj S, Peterson-Burch B, Schwartz C, Djukanovic V, Lenderts B, Feigenbutz L, Wang L, Alarcon C, Siksnys V, May G, N. Chilcoat D, Kumar S (2019) CRISPR-Cas9 editing in maize: systematic evaluation of off-target activity and its relevance in crop improvement. *Sci Rep* 9:6729–6740
- Zhang H, Zhang J, Wei P, Zhang B, Gou F, Feng Z, Mao Y, Yang L, Zhang H, Xu N, Zhu JK (2014) The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnol J* 12:797–807
- Zhang Q, Xing HL, Wang ZP, Zhang HY, Yang F, Wang XC, Chen QJ (2018) Potential high-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR/Cas9 in *Arabidopsis* and its prevention. *Plant Mol Biol* 96:445–456
- Zhou H, Liu B, Weeks DP, Spalding MH, Yang B (2014) Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. *Nucleic Acids Res* 42:10903–10914