

Aan de staatssecretaris van  
Infrastructuur en Milieu  
Mevrouw W.J. Mansveld  
Postbus 20901  
2500 EX Den Haag

**DATUM** 29 september 2014  
**KENMERK** CGM/140929-02  
**ONDERWERP** Signalering heroverweging van de criteria voor de moleculaire karakterisering bij markttoelatingen van gg-gewassen

Geachte mevrouw Mansveld,

Hierbij bied ik u de signalering “Heroverweging van de criteria voor de moleculaire karakterisering bij markttoelatingen van gg-gewassen” aan.

**Samenvatting:**

De COGEM heeft in 2008 vijf criteria opgesteld waaraan de moleculaire karakterisering bij markttoelatingen van genetisch gemodificeerde (gg-) gewassen moet voldoen. Kort gezegd moet precies bekend zijn welke elementen in de plant zijn gebracht, wat de functie van deze elementen is en wat de sequenties zijn. Tevens moeten de overgangssequenties tussen de insertie(s) en het genomische DNA van de plant bio-informatisch geanalyseerd worden.

Op basis van voortschrijdende wetenschappelijke inzichten, de sindsdien opgedane ervaring met vergunningaanvragen voor de introductie in het milieu van gg-gewassen en de discussies die gevoerd zijn binnen de COGEM, is besloten om de criteria uit 2008 verder uit te werken en te expliciteren en deze herziening in de vorm van een update vast te leggen.

Ook na herevaluatie blijven de eisen die de COGEM in 2008 aan de moleculaire karakterisering heeft gesteld grotendeels gelijk. Dit betekent bijvoorbeeld dat de analyse van nieuwe openleesramen (de zogenaamde fusie-ORFs) vereist blijft. Hoewel de kans dat een fusie-ORF wordt afgelezen en tot een eiwit leidt zeer klein is, kan dit niet uitgesloten worden. Ook kan niet uitgesloten worden dat het mogelijke product van de fusie-ORF toxische eigenschappen heeft.

De COGEM is verder van mening dat een insertie in een endogeen gen van de gemodificeerde plant een aandachtspunt moet zijn voor de milieurisicoanalyse. Het is niet uit te sluiten dat er (onverwachte) veranderingen in de biologische eigenschappen van de plant kunnen optreden wanneer een of meerdere genen uitgeschakeld worden.



De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,

Prof. dr. ing. Sybe Schaap  
Voorzitter COGEM

c.c.           Drs. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo  
                  Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenM

# **Heroverweging van de criteria voor de moleculaire karakterisering bij markttoelatingen van gg-gewassen**

## **COGEM signalering CGM/140929-02**

### **1. Inleiding**

Voordat een genetisch gemodificeerd (gg-) gewas kan worden toegelaten tot de Europese Unie wordt beoordeeld of dit gewas risico's oplevert voor mens en milieu. Bij de milieurisicoanalyse spelen de moleculaire karakterisering van het gg-gewas en de geïnsereerde sequenties een belangrijke rol. Informatie over het ingebrachte DNA, de gebruikte regulatoire sequenties en de bio-informatische analyse van de insertie en de omliggende regio's geven aanwijzingen over eigenschappen die (mogelijk) veranderd zijn.

De moleculaire karakterisering wordt gevolgd door een vergelijkende analyse van de relevante kenmerken van de genetisch gemodificeerde plant, zoals de samenstelling en de fenotypische en de agronomische kenmerken. Hierbij wordt onder meer gekeken naar de kans op verspreiding door pollen of zaden, het eventueel uitkruisen van een gg-gewas met wilde of andere verwanten en mogelijke veranderingen in persistentie, invasiviteit en verwilderings van de plant. Daarnaast wordt er gekeken naar eventuele nadelige effecten indien de ingebrachte genen zich in het milieu zouden verspreiden en worden eventuele effecten op niet-doelwitorganismen bestudeerd.

De COGEM heeft in 2008 enkele criteria opgesteld waaraan de moleculaire karakterisering van gg-gewassen moet voldoen:<sup>1</sup>

1. Bekend moet zijn welke elementen en in welk kopie-aantal de elementen in het plantengenoom zijn geïnsereerd. Ook moet de functie van deze elementen bekend zijn.
2. De gg-plant moet geanalyseerd worden op de aanwezigheid van DNA afkomstig van de transformatievector (het 'backbone' DNA).
3. Alle inserties moeten volledig gekarakteriseerd zijn door middel van sequentiebepaling en deze bepaling moet plaatsvinden tot in de flankerende sequenties van het genoom.
4. De overgangssequenties tussen de insertie(s) en het genomische DNA van de plant moet bio-informatisch geanalyseerd worden. Echter, er kunnen zich situaties voordoen waarbij hier gemotiveerd van afgeweken kan worden.
5. Bij de analyse van de theoretische fusie-ORFs moeten sequenties van stopcodon tot stopcodon geanalyseerd worden.

Op basis van voortschrijdende wetenschappelijke inzichten, de sindsdien opgedane ervaring met vergunningaanvragen voor de introductie in het milieu van gg-gewassen en de discussies die gevoerd zijn binnen de COGEM bij de beoordeling van vergunningaanvragen, is besloten om de criteria uit 2008 verder uit te werken en te expliciteren, en dit in een update van de signalering uit 2008 vast te leggen.

## 2. Moleculaire karakterisering: de verschillende elementen

Bij het vervaardigen van een gg-gewas worden hoofdzakelijk twee technieken gebruikt, transformatie met *Rhizobium radiobacter* (voorheen bekend als *Agrobacterium tumefaciens*) en 'particle bombardment'. Bij deze laatste procedure worden cellen beschoten met kleine metalen bolletjes waarop het te inserteren DNA is gecoat. Tegenwoordig wordt de transformatieprocedure met de bacterie *R. radiobacter* bij planten het meest toegepast.

*R. radiobacter* is een Gram-negatieve bacterie die van nature voorkomt in de bodem. *R. radiobacter* is in staat een DNA-fragment (T-DNA of *Transfer DNA*) te insereren in het genoom van een plantencel. Het T-DNA ligt op een plasmide en wordt geflankeerd door een linker en rechter border (LB en RB). Het DNA-fragment dat tussen de LB en RB ligt, zal tijdens een infectie door *R. radiobacter* worden overgedragen naar de plantencel en worden ingebouwd in het plantengenoom. *R. radiobacter* wordt daarom veel gebruikt om planten te transformeren met het gewenste DNA-fragment.<sup>2</sup>

### 2.1 De insertie

Voor de milieurisicobeoordeling is het belangrijk om te weten welke genen en sequenties in de plant gebracht zijn en wat de functies van deze elementen zijn. Een vereiste hiervoor is dat zowel een beschrijving van de transformatievector, de insertiecassette, de functies van de verschillende genen, de gebruikte regulatoire sequenties van de vector, en de sequentievolgorde van de insertiecassette beschikbaar is.

#### 2.1.1 Karakterisering van de inserties

##### Kopie aantal

Tijdens de transformatie is het mogelijk dat er meerdere kopieën van het gewenste DNA-fragment (het insert) in het plantengenoom worden ingebouwd. Deze kopieën kunnen zowel op dezelfde insertieplaats (in tandem) als verspreid door het genoom ingebouwd worden. Soms is niet de volledige insertie in een kopie aanwezig, maar mist er een gedeelte. De COGEM wijst erop dat de DNA volgorde van alle elementen die in het plantengenoom zijn ingebracht bekend moet zijn. Detectie van de geïnsereerde fragmenten is mogelijk door Southern blot-analyse waarbij het T-DNA-fragment gebruikt kan worden als probe om de inserties te identificeren.

Ook is het mogelijk om door een sequentiebepaling van het gehele genoom vast te stellen hoeveel (deel)kopieën van de insertie aanwezig zijn. De mogelijkheid om routinematig tegen lage kosten een volledige sequentiebepaling van het gehele genoom uit te voeren, ligt vooral bij planten met een klein genoom binnen handbereik. Het is te verwachten dat in de komende jaren analyses van de genoomsequentie als alternatief van Southern blot-analyses hun intrede doen. De COGEM wijst erop dat zij bij vergunningaanvragen het overleggen van de volledige genoomsequentie niet noodzakelijk acht. Wel is het noodzakelijk dat een bio-informatische analyse overlegd wordt

waaruit blijkt hoe de analyse is uitgevoerd en hoeveel (deel)kopieën van de insertie e.d. aanwezig zijn.

### Karakterisering inserties

De COGEM is van mening de inserties volledig moeten zijn gekarakteriseerd door middel van sequentiebepaling. Hiervoor is het noodzakelijk dat de gehele sequentie van het geïnsereerde DNA bepaald wordt tot in de flankerende sequenties van het plantengenoom. Van de flankerende sequenties moet aangetoond worden dat deze afkomstig zijn van het genoom van de gastheer. Dit kan worden vastgesteld door een bio-informatische analyse c.q. door de verkregen sequenties te vergelijken met bekende plantensequenties of door middel van PCR-analyse, waarbij gebruik gemaakt wordt van DNA afkomstig van de niet-gemodificeerde uitgangslijn of van een niet-gemodificeerde lijn met een genetische opmaak die zo dicht mogelijk bij dat van de gg-plant ligt.<sup>1,3</sup>

### **2.2 Analyse op het ontstaan van fusie-openleesramen**

Door de genetische modificatie kunnen er nieuwe openleesramen ontstaan op de insertieplaats, de zogenaamde fusie-ORFs. Een fusie-ORF bestaat voor een deel uit een sequentie van het uitgangsorganisme en voor een deel uit een sequentie van het geïnsereerde fragment. Het fusie-ORF kan hierbij in een ander leesraam liggen dan het leesraam van het toegevoegde transgen. In theorie kunnen er daarom maximaal twaalf fusie-ORFs ontstaan.

Opgemerkt moet worden dat de kans dat een eventueel fusie-ORF tot een functioneel eiwit leidt zeer klein is. Allereerst moeten de juiste regulatiesignalen aanwezig zijn voor transcriptie. Vervolgens moeten er voor translatiestructuren zoals de zogenaamde 5' CAP structuur, een startcodon en de polyA-staart aanwezig zijn.

Het ontstaan van nieuwe (fusie-)eiwitten kan echter niet worden uitgesloten. Er zijn in de literatuur verschillende moleculaire mechanismen beschreven die tot nieuwe genen kunnen leiden. In veel gevallen ontstaan nieuwe genen uit bestaande genen, bijvoorbeeld door mutaties, *exon shuffling*, genduplicaties en recombinaties. Het blijkt dat nieuwe eiwit-coderende genen ook *de novo* kunnen ontstaan uit niet-coderende DNA sequenties.<sup>4</sup> Een beperkt aantal genen die op deze wijze zijn ontstaan, zijn aangetroffen in onder andere *Drosophila*, planten en mensen.<sup>5,6</sup> Zo werden in *Drosophila melanogaster* bijvoorbeeld vijf 'nieuwe' genen aangetroffen (jonger dan vijf miljoen jaar) die uit niet-coderende sequenties zijn voortgekomen.<sup>7</sup> Opgemerkt moet worden dat dergelijke nieuwe genen meestal relatief eenvoudig zijn en vaak coderen voor korte, slecht gestructureerde eiwitten.<sup>6</sup>

---

<sup>1</sup> "The EFSA GMO Panel has, to date, required the use of non-GM lines with comparable genetic background as comparators. In the case of vegetatively propagated crops, these are the isogenic lines. In the case of sexually propagated crops these are non-GM lines as close as possible genetically to the GM plant under assessment." ..... "In the case of a GM plant, its isogenic line is the non – GM line from which the GM plant is derived."

De coderende sequentie voor een fusie-eiwit zal een combinatie zijn van DNA sequenties van de plant en het insert. Via raadpleging van sequentie databanken kan onderzocht worden of dergelijke sequenties homologie vertonen met eiwitten met specifieke biologische eigenschappen, zoals toxines en allergenen.

Het is lastig om genen aan bepaalde ecologische effecten te verbinden. Het is daardoor ook weinig zinvol om onbekende sequenties in een database te vergelijken voor de identificatie van veranderingen in ecologische karakteristieken. Dit ligt mogelijk anders voor gensequenties met een duidelijk nadelig effect, zoals toxines. Behalve voor de beoordeling van de voedselveiligheid (die in bijna alle gevallen wordt beoordeeld door andere instanties, zoals de Europese Voedselwarenautoriteit (EFSA), en het RIKILT) heeft de aanwezigheid van een potentieel toxine ook implicaties voor de milieurisicoanalyse, omdat het van invloed kan zijn op bijvoorbeeld niet-doelwitorganismen. Als er een homologie gevonden wordt, is dit een aanwijzing dat er een mogelijk toxine gevormd wordt wat verder onderzocht moet worden.

Hierbij moeten een aantal kanttekeningen geplaatst worden. De kans dat er significante homologie met een toxine in een database gevonden wordt, acht de COGEM zeer klein. Tot op heden heeft de COGEM nog nooit zo'n overeenkomst geconstateerd. Zelfs als er een sequentieovereenkomst is met een bekend toxine, betekent dit niet automatisch dat het potentieel gevormde eiwit ook toxische eigenschappen bezit. Ook als er geen sequentieovereenkomsten gevonden wordt, kan de gevonden sequentie nog steeds onderdeel van een toxisch eiwit zijn indien dit eiwit (nog) niet in de database staat.

Op basis van bovenstaande gegevens is de COGEM van mening dat de kans dat een fusie-ORF wordt afgelezen en tot een eiwit leidt zeer klein is, maar niet uitgesloten kan worden. Ook kan niet uitgesloten worden dat het gevormde eiwit mogelijk toxische eigenschappen heeft. De COGEM is daarom van mening dat de overgangsgebieden geanalyseerd moeten worden op de aanwezigheid van ORFs die bepaald zijn van stop tot stopcodon en die coderen voor peptides groter dan acht aminozuren. Er is gekozen voor acht aminozuren, omdat dit de minimale grootte is van een allergeen epitoom.<sup>8</sup>

### **2.3 Analyse op aanwezigheid vector (backbone) DNA**

Zoals eerder beschreven wordt *R. radiobacter* gebruikt om gewenste DNA sequenties in het plantengenoom te inserteren. Deze DNA sequenties worden tussen de linker- en rechter border van het T-DNA gekloond. Het kan voorkomen dat er onbedoeld plasmide-DNA (alle sequenties die buiten de borders liggen) samen met het transgen in het plantengenoom geïnserteerd wordt. Dit plasmide-DNA wordt ook wel 'backbone'-DNA genoemd. Het backbone-DNA kan bijvoorbeeld een antibioticum-resistentiegen bevatten. Ook bij 'particle bombardment' kunnen onbedoeld vectorsequenties ingebouwd worden ten gevolge van onvoldoende opzuivering van het te insereren fragment voordat dit op de metalen bolletjes wordt gecoat.

Om de risico's van een gg-gewas te kunnen beoordelen is het belangrijk om te weten of en welke delen van het bacteriële backbone-DNA in een gg-gewas terecht zijn gekomen zodat de eigenschappen die op het ingebrachte backbone-DNA liggen, meegenomen kunnen worden in de risicobeoordeling. De COGEM is daarom van mening dat uit de moleculaire karakterisering van een gg-gewas moet blijken of backbone-DNA in het gg-gewas aanwezig is. Dit kan onder andere worden beoordeeld op basis van Southern blot-analyses. Indien backbone-DNA aanwezig is moet hiervan de sequentie bepaald worden tot in de flankerende planten-DNA sequenties, zodat duidelijk is welke sequenties en genen zijn ingebouwd en er een analyse van fusie-ORF's kan plaatsvinden.

#### **2.4 Herschikkingen komen van nature voor in het plantengenoom**

Door het proces dat gepaard gaat met het inbrengen van DNA in het plantengenoom worden herschikkingen in het genomisch-DNA in de hand gewerkt. Vooral bij '*particle bombardment*' worden tal van breuken in het genomisch-DNA veroorzaakt die leiden tot herschikkingen. Herschikkingen komen echter ook van nature voor in het plantengenoom.

De afgelopen jaren is steeds duidelijker geworden dat het genoom geen statisch geheel is, maar continu onderhevig is aan veranderingen, herschikkingen, deleties en inserties.<sup>9,10</sup> Bij elke meiotische en mitotische deling worden herschikkingen (rearrangements, translocaties, inversies, duplicaties, 'single nucleotide polymorphisms' (SNPs), etc) in het genoom geïntroduceerd.<sup>11,12,13</sup> Deze '*genome rearrangements*' zijn een natuurlijk en frequent voorkomend fenomeen en een drijvende kracht achter de evolutie.

Of een 'herschikking' van genomisch DNA leidt tot een veranderde eigenschap van de plant is niet of nauwelijks te voorspellen. Bio-informatische analyse van eventuele herschikkingen in het genoom heeft daarom een geringe voorspellende waarde. Veldproeven geven meer informatie over de biologische karakteristieken van een gg-gewas. Omdat eventuele additionele herschikkingen ten gevolge van het inbrengen van DNA in het plantengenoom gering zullen zijn ten opzichte van de genoomveranderingen die van nature optreden en gezien de geringe voorspellende waarde van een bio-informatische analyse, acht de COGEM een analyse van eventuele herschikkingen in het genoom niet noodzakelijk voor de risicobeoordeling van gg-gewassen.

De COGEM maakt echter een uitzondering als het ingebrachte gen in een bekende functionele regio van het plantengenoom terecht is gekomen. De voorspellende waarde van de gevolgen van de verstoring van een endogeen gen is groter en zou daarom een aandachtspunt moeten zijn voor de verdere milieurisicoanalyse. In de volgende paragraaf wordt uitgelegd welke overwegingen hieraan ten grondslag liggen.

##### **2.4.1 Analyse verstoring van endogene genen**

De insertie van T-DNA via *R. radiobacter* transformatie is een schijnbaar willekeurig proces. Het insert kan op iedere plek in het plantengenoom terechtkomen. Bij de meeste vergunningaanvragen voor markttoelating die de COGEM in de loop der jaren heeft behandeld, was het T-DNA

aanwezig in niet-coderende regio's van het genoom. In een enkel geval werden er aanwijzingen gevonden dat het insert in een functioneel gebied van het plantengenoom terecht was gekomen.<sup>14</sup> De COGEM kon toen op basis van de aangeleverde moleculaire gegevens niet uitsluiten dat het T-DNA de expressie van een endogeen gen beïnvloedde. Echter, uit de fenotypische analyse bleek dat de gg-plant fenotypisch equivalent was aan de uitgangsplant.

De verstoring van een endogeen gen kan een gewenst effect (gerichte inactivatie) of ongewenst effect (onbedoelde inactivatie) hebben. Ook kan een insertie in een regulerende sequentie (bijvoorbeeld een promotor) tot activatie of inactivatie van genen leiden. De functie van een endogeen gen kan divers zijn en de gevolgen van inactivatie als gevolg van een T-DNA insertie kan daardoor ook verschillen. Inactivatie kan tot grote effecten leiden die tijdens het ontwikkelingsproces zullen opvallen, bijvoorbeeld inactivatie van genen die een functie hebben in de ontwikkeling, groei, oogstbare producten, etc. Het is echter niet uit te sluiten dat een verstoring ook kleinere effecten kan hebben die niet direct onderkend worden tijdens het ontwikkelingsproces. Metabole routes kunnen bijvoorbeeld verstoord raken door inactivatie van enzymen met een functie in deze routes. Bepaalde eigenschappen van gewassen, zoals voedselkwaliteit, smaak, voedingswaarde, toxiciteit en allergeniciteit hangen direct samen met de aan- of afwezigheid van specifieke combinaties van metabolieten. Tevens werken sommige metabolieten in vaak lage concentraties als signaalstoffen naar andere organismen, zoals schimmels, herbivoren of bestuivers.

De COGEM merkt op dat de functies van het merendeel van de plantengenen nog niet bekend zijn. Om die reden is ook niet uit te sluiten dat er onverwachte veranderingen in het gedrag van de plant kunnen optreden wanneer een endogeen gen onbedoeld uitgeschakeld wordt. Daarom is de COGEM van mening dat een insertie in een endogeen gen of in een regulerende sequentie (zoals een promotor) een aandachtspunt moet zijn voor de verdere milieurisicoanalyse. De mogelijke gevolgen van een dergelijke insertie moeten vooral onderzocht worden tijdens de fenotypische analyse.

Overigens is het de ervaring van de COGEM dat de meeste vergunningaanvragen gegevens bevatten over een eventuele verstoring van endogene genen.

### ***2.5 Inserties van chloroplast-DNA treden van nature met hoge frequentie op***

Met name bij de transformatie van planten door middel van 'particle bombardment' treedt vaak co-integratie op van DNA afkomstig uit de chloroplast. Integratie van chloroplast-DNA in het nucleaire genoom is een proces dat zich van nature al op grote schaal voordoet. Gedurende de evolutie zijn er door dit proces talloze plantengenen ontstaan.<sup>15,16,17,18</sup> Uit onderzoek blijkt dat de integratie van chloroplast-DNA in het nucleaire DNA met een hoge frequentie optreedt (in 1 op de 16.000 tot 1 op de 49.000 gevormde pollenkorrels of zaailingen).<sup>19,20</sup> Tegenover de constante integratie van chloroplast-DNA staat een continu proces van verwijdering van deze sequenties waardoor er een evenwicht is tussen de 'instroom en uitstroom' van chloroplast sequenties.<sup>21</sup>



In het licht van het bovenstaande concludeert de COGEM dat insertie van chloroplast- DNA in het nucleaire DNA een natuurlijk en vaak voorkomend fenomeen is. Eventuele theoretische risico's verbonden aan de co-integratie van chloroplast-DNA bij genetische modificatie overschrijden daarmee niet de baseline van 'natuurlijk aanwezige risico's'. Derhalve is de COGEM van mening dat een sequentiebepaling en een bio-informatische analyse van de overgang tussen eventueel geïntegreerd chloroplast-DNA en genomisch nucleair-DNA niet noodzakelijk is.

### ***2.6 Epigenetische signaalsequenties***

De insertie van een gen in het plantengenoom kan leiden tot epigenetische effecten. Deze effecten zouden bijvoorbeeld het gevolg kunnen zijn van een inkomend transgen dat de normale epigenetische regulatie verstoort en daarmee de expressie van een endogeen gen beïnvloedt. Daarnaast zouden endogene epigenetische mechanismen de bedoelde expressie van het transgen kunnen beïnvloeden, bijvoorbeeld door onderdrukking van deze expressie.

Om transgen-geassocieerde verschillen in epigenetische mechanismen te detecteren, is kennis nodig van de normale epigenetische opmaak van het DNA onder verschillende condities (de zogenoemde baseline) en een definitie van de veranderingen die als afwijkend moeten worden beschouwd. Echter, op dit moment is niet duidelijk binnen welke grenzen de variatie in cellen, weefsels of organismen als 'normaal' moeten worden beschouwd. Tevens is bekend dat milieufactoren en groeiomstandigheden epigenetische variatie kunnen veroorzaken, maar ook hierbij is het onduidelijk in welke mate dit gebeurt en wat natuurlijke variatie is. Het vaststellen van een 'normale' baseline is dus nog niet mogelijk.

De COGEM merkt op dat er met het geheel aan onderzoeken (waaronder kas- en veldproeven en inhoudsanalyses) die plaatsvinden in het kader van de huidige ggo risicoanalyse, mogelijke onbedoelde epigenetische effecten in gg-gewassen opgemerkt kunnen worden. Op grond hiervan is de COGEM van mening dat epigenetische effecten thans niet in de moleculaire karakterisering beschouwd hoeven te worden

### **3. Conclusies**

De COGEM heeft haar eerdere criteria voor de moleculaire karakterisering van gg-gewassen zoals vastgelegd in 2008 opnieuw tegen het licht gehouden. De COGEM ziet geen wetenschappelijke gronden redenen om deze criteria aan te passen. Wel heeft ze als aanvullend criterium opgenomen dat geanalyseerd moet worden of de insertie in een endogeen gen heeft plaatsgevonden. Is dit het geval dan is dit aanleiding om in de verdere milieurisicoanalyse, zoals bij de veldproeven, hieraan speciale aandacht te besteden.

### **Referenties**

1. COGEM (2008). Heroverweging criteria voor de moleculaire karakterisering bij markttoelatingen van gg-

Gewassen. COGEM advies CGM/081219-01

2. Gelvin SB (2003). *Agrobacterium*- mediated plant transformation: the biology behind the “Gene-Jockeying” tool. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 16-37
3. European Food Safety Authority (EFSA). Guidance on selection of comparators for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed. *EFSA Journal* 2011;9(5): 2149
4. Long M *et al*, (2003). The origin of new genes: glimpses from the young and old. *Nat Rev Genet.* 4(11): 865-875.
5. Ding Y *et al*, (2012). Origins of new genes and evolution of their novel functions. *Annu. Rev. Ecol. Syst* 43:345-63
6. Neme R & Tautz D (2013). Phylogenetic patterns of emergence of new genes support a model of frequent *de novo* evolution. *BMC Genomics.* 21; 14:117
7. Levine MT *et al*, (2006). Novel genes derived from noncoding DNA in *Drosophila melanogaster* are frequently X-linked and exhibit testis-biased expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 27: 9935-9939.
8. Thomas K *et al*, (2005). *In silico* methods for evaluating human allergenicity to novel proteins: International bioinformatics workshop meeting report, 23-24 February 2005. *Toxicological sciences* 88: 307-310
9. Nowacki M *et al*, (2008). RNA-mediated epigenetic programming of a genome-rearrangement pathway. *Nature* 451: 153-159
10. Eckardt N (2006). Genomic hopscotch: gene transfer from plastid to nucleus. *Plant Cell* 18: 2865-2867
11. Cai X & Xu S (2007). Meiosis-Driven Genome Variation in Plants. *Current Genomics*, 8: 151-161
12. Hamant O *et al*, (2006). Genetics of meiotic prophase in plants. *Annual Review of Plant Biology* 57: 267-302
13. Petes T (2001). Meiotic recombination hot spots and cold spots. *Nature Reviews Genetics* 2: 360-369
14. COGEM (2013). Import of genetically modified soybean DAS-44406-6 with three herbicide tolerance Traits. COGEM advice CGM/130627-01
15. Leister D (2005). Origin, evolution and genetic effects of nuclear insertions of organelle DNA. *Trends in genetics* 21:655-663
16. Timmis J *et al*, (2004). Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nature Reviews* 5: 123-135
17. Shakhmuradov I *et al*, (2003). Abundance of plastid DNA insertions in nuclear genomes of rice and *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 52:923-934
18. Stegemann S *et al*, (2003). High frequency gene transfer from the chloroplast genome to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100: 8828-8833
19. Huang CY *et al*, (2004) Simple and complex nuclear loci created by newly transferred chloroplast DNA in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101: 9710-9715
20. Sheppard AE *et al*, (2008). Transfer of plastid DNA to the nucleus is elevated during male gametogenesis in tobacco. *Plant Physiology* 148: 328-336
21. Matsuo MY *et al*, (2005). The rice nuclear genome continuously integrates, shuffles, and eliminates the chloroplast genome to cause chloroplast-nuclear DNA flux. *Plant Cell* 17:665-675