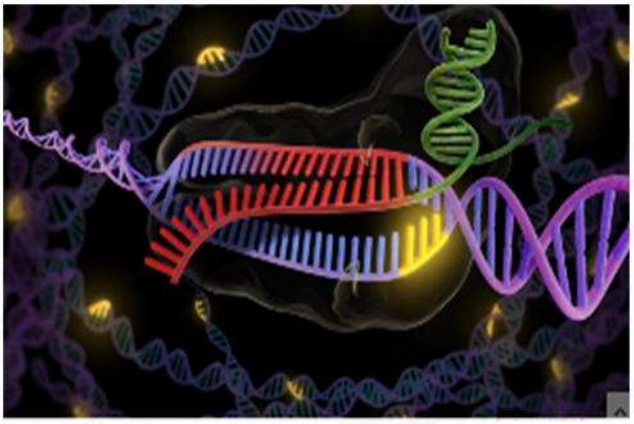
CRISPR/CAS9 در کشاورزی

هدی سادات کیانی [1]

دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی

دانشگاه تهران

توانایی ویرایش دقیق و هدفمند هر نقطه‌ای از ژنوم موجودات برای سال‌های طولانی آرزوی دانشمندان بوده است. با کشف سیستم CRISPR/ Cas9 ابزاری برای اصلاح ژن در اختیار دانشمندان قرار گرفت که در دنیا هیاهویی ایجاد کرد. این ابزار سریع، ارزان و بسیار دقیق‌تر از تکنیک‌هایی است که قبلاً برای ویرایش ژن استفاده می‌شد و دارای طیف گسترده ای از برنامه‌های کاربردی بالقوه است.



۱- کریسپر چیست؟

نوعی تکنولوژی جدید ویرایش ژنتیکی است که می‌تواند به پیشرفت ژن‌درمانی کمک‌های زیادی بکند. تاکنون ژن‌درمانی عمدتاً از طریق تکنیک انتقال ژن (gene transfer) انجام شده است؛ به این صورت که یک ویروس بی‌گزند، نسخه‌ی سالمی از یک ژن را به سلول منتقل می‌کند تا جای ژن معیوب را که بیماری ایجاد کرده، بگیرد؛ اما در روش کریسپر، دانشمندان می‌توانند مستقیماً ژن معیوب را اصلاح کنند.

آن‌ها DNA معیوب را جدا کرده و به جای آن یک DNA سالم می‌گذارند. قاعدتاً، این روش باید خیلی بهتر از اضافه کردن یک ژن جدید جواب دهد، چون در این صورت خطرات ناشی از اضافه کردن یک ژن غریبه و خارجی از میان می‌رود. گاهی اوقات ممکن است این ژن خارجی در مکان اشتباهی قرار گیرد و منجر به سرطان شود؛ اما ژنی که با تکنیک کریسپر ترمیم شده تحت کنترل خواهد بود.

۱-۱- فرایند کریسپر_کَس ۹ چیست؟

به گزارش بایو وان مرکز تخصصی بیوتکنولوژی و زیست شناسی نوین در ایران؛ کریسپر- کَس ۹ ابزاری برای اصلاح ژن است که در دنیا هیاهویی ایجاد کرده است. این ابزار سریع، ارزان و بسیار دقیق‌تر از تکنیک‌هایی است که قبلاً برای ویرایش ژن استفاده می‌شده و دارای طیف گسترده‌ای از برنامه‌های کاربردی بالقوه است. کریسپر- کَس ۹ تکنولوژی منحصربه‌فردی است که این امکان را ایجاد می‌کند تا بتوان با حذف و اضافه کردن یا جایگزین کردن، بخشی از ژنوم را ویرایش نمود. این روش در حال حاضر روشی ساده، دقیق و تطبیق‌پذیر برای دست‌ورزی ژنتیک می‌باشد.

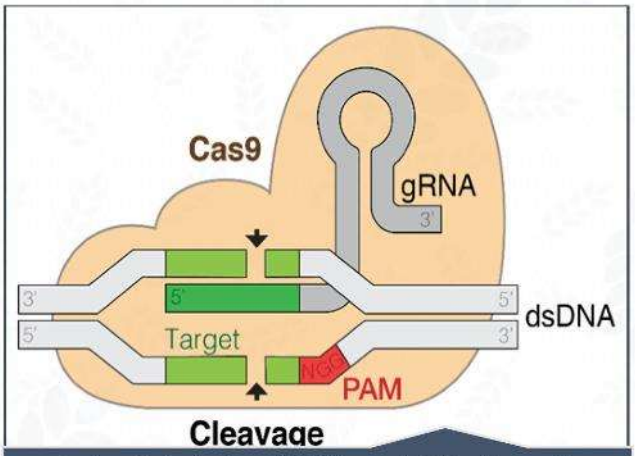
1. h.kiani@ut.ac.ir

در حقیقت برخی از باکتری‌ها دارای سیستم ساده کریسپر- کَس ۹ برای ویرایش ژن می‌باشند که برای پاسخ به عوامل مهاجم نظیر ویروس‌ها بکار می‌رود و این فرآیند مانند سیستم ایمنی برای آن‌ها تلقی می‌شود.

کریسپر در باکتری‌ها قسمتی از DNA باکتری را قطع کرده و در تهاجم بعدی به باکتری برای شناسایی پاتوژن کمک می کند. دانشمندان از این سیستم در سلول‌های دیگر جانوران شامل موش و انسان استفاده کرده‌اند.

۱-۲- عملکرد کریسپر- کَس ۹:

قطعه‌ای از RNA شامل توالی ریبونوکلئیک‌اسید از پیش طراحی‌شده با طول حدود ۲۰ باز را RNA راهنما (gRNA) می‌گویند. این RNA داربست به DNA اتصال می‌یابد و توالی پیش‌ساخته‌ی راهنمای کَس ۹ به آنزیم دستور می‌دهد که به کجای DNA متصل شود. کَس ۹ با پیروی از RNA راهنما در همان قسمت از رشته DNA دو رشته DNA را می‌برد. در این مرحله سلول DNA آسیب‌دیده را شناسایی کرده و سعی می‌کند تا آن‌ها ترمیم کند.



سیستم کریسپر- کَس ۹ شامل دو مولکول کلیدی برای ایجاد تغییر یا جهش در DNAمی باشد.که عبارت اند از:

• یک آنزیم به نام کَس ۹ این آنزیم به عنوان یک جفت قیچی مولکولی عمل می کند که می تواند دو رشته DNA را در محل خاصی از ژنوم برش دهد که آن قسمت کوچک DNA می تواند بعدا اضافه یا حذف شود.

۲- کاربرد سیستم CRISPR/Cas9 در کشاورزی

بهبود کیفیت محصولات کلاسیک دام، مانند گاو، طیور و خوک‌ها، توسط مهندسی ژنوم مبتنی بر کریسپر تسریع شده است. دامداران قبلاً مارکرهای کروموزومی مرتبط با صفات شناخته‌شده به‌عنوان صفات کمی را شناخته‌اند و از کمک مارکرها استفاده می‌کنند تا ویژگی‌های ارزشمندی را به طور انتخابی پیش‌گویی کنند. این‌روند با استفاده از فناوری های ویرایش ژن، به‌تازگی در خوک‌ها و گاوهای لبنی به ترتیب به‌منظور محافظت در برابر ویروس‌ها و حذف شاخ‌ها، نشان داده شده است. کاربرد دیگر این سیستم در حیوانات، مهندسی تولید محصولات پزشکی یا تولید بافت است.

به‌عنوان‌مثال، اضافه کردن cDNA آلبومین انسانی به لوکوس آلبومین خوک با استفاده از CRISPR/Cas9 می‌تواند تولید آلبومین را با استفاده از خوک‌های تراریخته فعال کند. مهندسی فعال کریسپر در محصولات تجاری و مدل‌های آزمایشگاهی برای افزایش عملکرد ایده آل، افزایش تحمل به خشکی و افزایش رشد در شرایط محدود مواد غذایی و تولید محصولات با خواص تغذیه‌ای بهبودیافته مورد استفاده قرار می گیرد. استفاده از تکنولوژی کریسپر در ذرت و سویا نشان‌دهنده‌ی سرعت پذیرش تکنولوژی کریسپر خارج از آزمایشگاه است.

هدف قرار دادن ژن مبتنی بر کریسپر نیز می‌تواند برای مبارزه با بیماری‌های گیاهی مورد استفاده قرار گیرد، همان‌طور که برای ویروس Curl leaf زرد گوجه‌فرنگی در Nicotiana benthamian نشان داده شده‌است.

۲-۱- کاربرد سیستم کریسپر در مواد غذایی و بیوتکنولوژی صنعتی

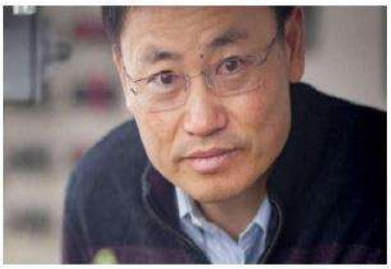
تا به امروز، کاربرد سیستم‌های کریسپر در باکتری‌ها شامل ژنوتیپ، کشت محصولات صنعتی علیه ویروس‌ها، کنترل جذب و انتشار ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک توسط باکتری‌ها و کشت‌های پروبیوتیک مهندسی می‌باشند. موفقیت تجاری سیستم ایمنی طبیعی کریسپر برای واکسیناسیون استرپتوکوکوس ترموفیلوس که از آن در فراورده‌های لبنی (ماست و پنیر) استفاده‌می‌شود، راه را برای استفاده از این سیستم در تغذیه هموار کرده است. کار اخیر نیز ثابت کرد که مفهوم باکتری مفید یعنی ایمن ماندن در برابر جذب و انتشار

ژن‌هایی که مقاومت آنتی‌بیوتیکی را رمزگذاری می‌کنند. فناوری کریسپر تأثیر گسترده‌ای بر تمامی صنایع مربوط به باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها خواهند داشت، چراکه ما درصدد استفاده گسترده از ویرایش‌کننده ژنوم در این ارگان‌ها هستیم.

احتمالاً CRISPR/Cas9 برای مهندسی باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌های صنعتی برای تولید مواد شیمیایی سبز، ازجمله سوخت‌های زیستی و مواد بیولوژیکی استفاده می‌شود.

۲-۲- استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 برای افزایش عملکرد برنج

گروهی از محققان دانشگاه Purdue و آکادمی علوم چین از تکنولوژی ویرایش ژن CRISPR/Cas9 برای افزایش عملکرد برنج استفاده کرده‌اند. نتایج این پژوهش افزایش ۳۱-۲۵ درصدی تولید برنج بود که در پروژه‌های اصلاح سنتی، این عمل تقریباً غیرممکن است.



این تحقیق به رهبری پروفسور ژو (Zhu)، استاد برجسته بخش علوم باغبانی، با اعمال جهش در ۱۳ ژن مرتبط با هورمون آبسزیک اسید صورت گرفت. این هورمون در تنش های گیاهی نقش بسیار مهمی دارد و باعث سرکوب رشد در گیاه می‌گردد.

از بین واریته‌های به‌دست‌آمده، یکی از این گیاهان با وجود تغییر جزئی در تحمل به تنش، در شرایط مزرعه‌ای با افزایش تولید ۲۵ درصدی و در شرایط آزمایشگاهی با افزایش محصول تا میزان ۳۱ درصد روبرو بود. این گروه با استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 موفق به خاموشی ژن‌های PYL (یکی از اجزای تنظیمی گیرنده آبسزیک اسید) شدند. این ژن‌ها علاوه بر افزایش تحمل به تنش‌های غیرزیستی، همچون خشکی، شوری و دیگر عوامل محیطی در گیاه، مانع رشد آن نیز می‌شوند.

ازآنجایی‌که گیاهان در طی تکامل ویژگی‌های ژنتیکی بسیاری را توسعه داده‌اند، ازاین‌رو نمی‌توان تنها با خاموشی یک ژن تغییر چندانی در گیاه به‌وجود آورد؛ اما با ترکیبی از خاموشی ژن‌ها می‌توان ویژگی‌های مدنظر در گیاه را ایجاد نمود. دکتر Zhu دراین‌باره می‌گوید: "شواهد فراوانی وجود دارد که بیان می کند هرچند هرکدام از ژن‌های PYL ممکن است یک عملکرد منفرد و اختصاصی داشته باشد، اما درعین‌حال می‌توانند در دیگر فرایندها نیز دارای عملکرد باشد. درنتیجه، زمانی که شما تنها یکی از این ژن‌ها را خاموش می‌کنید، دیگر ژن‌ها به‌عنوان یک جایگزین در این فرآیند فعالیت می‌کنند و به‌همین دلیل تغییر چندانی در گیاه دیده نمی‌شود."

با بهره‌گیری از این تکنولوژی CRISPR/Cas9، دکتر Zhu و همکاران توانستند چند ژن را در یک زمان تغییر دهند که این امر در صورت استفاده از روش‌های اصلاح سنتی چند دهه طول می‌کشید.

گیاهان دستکاری‌شده برنج در این آزمایش‌ها مربوط به یک پروژه مشترک می‌باشند. گام بعدی در این پروژه، استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 به‌منظور ویرایش برخی ژن‌ها در واریته‌های مهم و پرمحصول برنج است تا بتوان فهمید که آیا این واریته‌ها چنین افزایش عملکردی از خود نشان می دهند یا خیر. دکتر Zhu بر این باور است که اگر این مقدار عملکرد را در گیاهان برنجی که در حال حاضر به‌عنوان ارقام پرمحصول کشت می‌شوند ببینیم، می توان امیدوار بود که در آینده‌ای نه‌چندان دور، کمک بسیار مهمی به تغذیه مردم جهان خواهیم کرد.

۲-۳- مروری بر سیستم CRISPR/Cas9 به‌عنوان ابزار ویرایش ژنوم کارآمد در توسعه گیاهان تراریخت

سیستم تناوب‌های کوتاه پالیندروم فاصله‌دار منظم خوشه‌ای (CRISPR/Cas9) Cas9 یکی از روش‌های مؤثر و جدید ویرایش هدفمند ژنوم است که در جهت ارتقای کیفیت و عملکرد گیاهان زراعی و ایجاد صفات جدید گیاهی مورد استفاده است.

همان‌طور که گفته شد سازوکار CRISPR/Cas9 به‌طور گسترده در ویرایش ژنوم، خاموشی ژن، کنترل فرآیند رونویسی همراه با اختصاصی بودن بالا و کاهش اثرات توالی‌های غیر هدف توسط برش‌های دورشته‌ای (DSBs) در DNA ژنومی و تغییر در توالی نوکلئوتیدی ژن هدف در بسیاری از سیستم های گونه‌های متنوع گیاهی و جانوری توسعه یافته است. توسعه گیاهان زراعی ویرایش ژنتیکی (GE) به‌طور کامل مشابه با گیاهان زراعی اصلاحی معمول نشان‌دهنده کارآمدی و پایداری این محصولات در شرایط مختلف آب وهوایی بوده، ازنظر پذیرش اجتماعی، ملاحظات زیست محیطی و سلامت انسان تراپخته در روند آزادسازی در اولویت مصرف هستند.

۲-۴- دستاوردهای CRISPR/Cas9 در گیاهان

سیستم CRISPR/Cas9 جهش‌های پایدار و قابل توارثی را ایجاد می‌کند که به‌راحتی می‌توان از ساختار Cas9/gRNA جهت تغییرات بیشتر توسط CRISPR/Cas تمیز داد. این امر منجر به توسعه گیاهان هموزیگوت غیر تراریخته که تنها در یک نسل تولید شده‌اند، می‌شود.

بر اساس مطالعه‌ای که (Xu و همکارانش، ۲۰۱۵) انجام دادند و موفق شدند یک رقم زراعی برنج غیر تراریخته همراه با جهش در ژن هدف توسط تفرق ترانس‌ژن با ایجاد خودگشنی در نسل T1 تولید کنند. در سال ۲۰۱۴ ژینگ و همکارانش یک سری ناقل‌های دوتایی مبتنی بر سیستم CRISPR/Cas9 با قابلیت بیان پایدار در سیستم‌های گیاهی و یک سری ناقل‌های حاوی ماژول gRNA را طراحی کردند. ازاین‌رو، انتقال تنها پروتئین نوکلئاز Cas9 و gRNA به درون سلول میزبان توسط روش‌های انتقال ژنتیکی تنها ضرورت ویرایش ژنوم گیاهی به‌شمار می‌رود. Baltes و همکارانش (۲۰۱۴) پیشنهاد کردند که رپلیکون جیمینی ویروس‌ها (GVRs) جهت انتقال ساختار Cas9/gRNA به درون سلول میزبان زمانی که ژن پروتئین آغازکننده همانندسازی (REP) ویروس همراه با ساختار Cas9/gRNA انتقال داده می‌شود، می‌تواند مورداستفاده قرار گیرد.

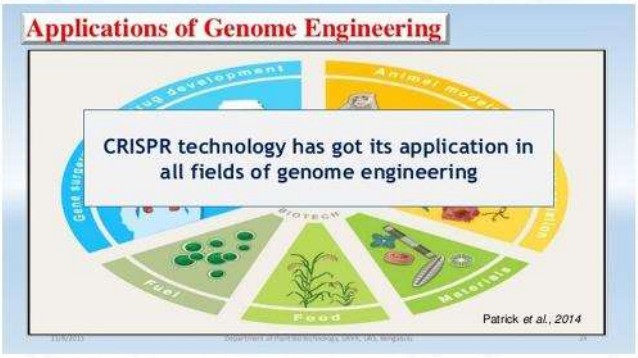
علاوه‌براین، جهت استفاده از این سیستم در ارتقا و کشف صفات ژنتیکی، روش‌های انتقال با کارایی بالا مانند ویروس‌های مبتنی بر همانندساز DNA جهت انتقال مواد مهندسی ژنوم بدون نیاز به روش‌های انتقال مهندسی ژنتیک مورداستفاده قرار می‌گیرد. بر اساس پژوهش‌های صورت گرفته، انتقال مستقیم با استفاده از ویروس جغجغه توتون (TRV) ، ویروس پیچیدگی برگ کلم(CaLCuV) ، امکان‌سنجی انتقال Cas9/gRNA توسط ویروس‌های مختلف در ویرایش ژنوم گیاهان مختلف به وضوح نشان داده‌شده است.

۳- ایمنی زیستی و مقبولیت CRISPR/Cas9

جهش‌هایی که توسط سیستم CRISPR/Cas9 در گیاهان ایجاد می‌شوند ابعاد جدیدی را در پژوهش‌های زیست‌شناسی گیاهی گشوده است. استفاده از جهش‌زایی تصادفی و سنتی به‌دلیل طبیعت ادغام تصادفی ژن‌ها قادر به غیرفعال سازی هرژنی نیست. فناوری CRISPR/Cas9 می‌تواند در ایجاد جهش‌های ژن‌های غیرقابل‌دسترس بهترین کمک باشد. به‌طوری‌که این سیستم با ایجاد جهش‌هایی در مکان‌های ژنی چندگانه و ایجاد حذف‌های بزرگ می‌تواند اصلاح گیاهان را بدون انتقال ژن خارجی شتاب دهد. این درحالی است که اگر برخی نگرانی‌ها و شک و تردیدهای مربوط به سلامتی انسان و محیط‌زیست گیاهان تراریخته را کنار بگذاریم، گیاهان زراعی تراریخته می‌توانند بهترین راه‌حل در توسعه و ارتقای کیفیت و عملکرد گیاهان زراعی حال حاضر باشند.

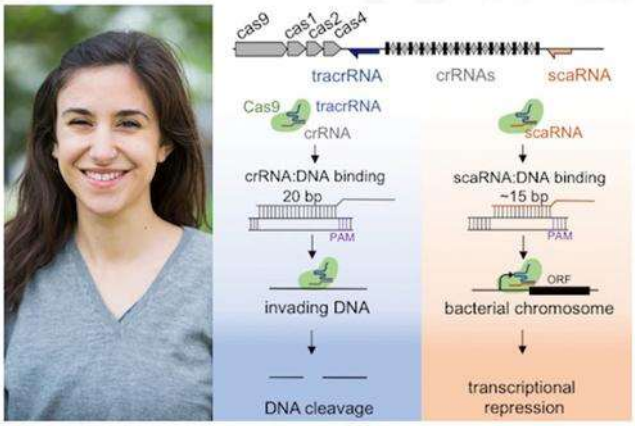
روش‌های اصلاح سنتی گیاهان زراعی با استفاده از جهش‌های تصادفی و ایجاد تنوع ژنتیکی همواره یک صفت جدید را به ارقام زراعی وارد می‌کنند. این درحالی است که در سیستم CRISPR/Cas9 تغییرات ایجاد شده در ژنوم گیاهی بسیار دقیق، قابل وراثت و پایدار است.

گسترش بهره‌برداری از فناوری CRISPR/Cas9 در پژوهش‌های کاربردی گیاهان و مزیت‌های آن در اصلاح گیاهان زراعی جهت تأمین امنیت غذایی جهانی به‌طور کامل بستگی به کارایی و پذیرش عمومی ارقام زراعی GE در جهان دارد.



۴- کشف روشی متفاوت از عملکرد CRISPR/Cas 9

قبل از اینکه انسان از کریسپر به‌عنوان یک ابزار برای ویرایش ژن استفاده کند باکتری‌ها از آن به‌عنوان یک سیستم ایمنی درونی در مقابل فاژها استفاده می‌کردند و بدین‌وسیله DNA فاژ را با وسیله‌ای مانند قیچی قطعه‌قطعه می‌کردند. در یک باکتری به نام F. novicida آنزیم Cas 9 ژن‌هایی را کنترل می‌کند که باید برای ایجاد بیماری خاموش شوند. بدین منظور RNA راهنمای همراه آنزیم Cas طول کوتاهی دارد و به همین دلیل اجازه برش به آنزیم نمی‌دهد و تنها می‌تواند ژن را خاموش کند و باعث بیماری شود. دانشمندان موفق به مهندسی دوباره Cas 9 برای سرکوب ژن‌های هدفی شدند که باعث مقاومت باکتری به آنتی‌بیوتیک می‌شود و دوباره باکتری را حساس می‌سازند. درواقع قابلیت برنامه‌دهی چندگانه به Cas 9 باعث تنوع انواع ویرایش ژنومی می‌شود.



دانشجوی تحصیلات تکمیلی هانا راتنر و همکارانش دریافتند که نقش Cas9، در دفاع از فاژ در انواع مختلف باکتری‌ها شناخته‌شده است، همچنین ژن‌های مرتبط با ویروس در F. novicida را تنظیم می‌کند.

۵- آینده کریسپر- کَس ۹

بیشتر تحقیقات هنوز بر روی مدل‌های حیوانی یا سلول‌های جدا شده از انسان متمرکز است با این هدف که در نهایت از این تکنولوژی برای درمان بیماری در انسان استفاده شود.کارهای زیادی برای از بین بردن اثرات خارج از هدف این سیستم وجوددارد؛ بهاین معنا که کریسپر- کَس ۹ می‌تواند قسمت دیگری از ژن که هدف نیست را برش دهد.

• دانشمندان برای یافتن راهی که کریسپر- کَس ۹ به‌درستی متصل و قطعه را برش دهد کار می‌کنند که دو راه موجود است:

۱- طراحی بهتر و اختصاصی RNA های راهنما بر اساس اطلاعات توالی DNA موجود و رفتارهای غیر هدف RNA راهنما که می‌تواند به توالی‌های غیر هدف متصل شود.

۲- استفاده از آنزیم کَس ۹ که فقط یه رشته از DNA را برش می‌دهد. این بدین معناست که باید دو آنزیم کَس ۹ و دو RNA راهنما در همان مکان برای ایجاد برش وجود داشته باشد. این عمل باعث کاهش خطا در برش می‌شود.

در حال حاضر این روشن است که پتانسیل کَس ۹ فراتر از برش در DNA است و سودمندی آن در بکارگیری اختصاصی پروتئین تنها با تخیل ما محدود خواهد بود.

این روش برای اکثر بیماری‌ها مفید است، مثلاً بیماری‌های دیستروفی ماهیچه‌ای و فیبروز سیستیک باید از طریق ویرایش ژنتیکی درمان شوند. اگر پزشکان سلول‌های فرد بیمار را جدا کرده و آن‌ها را ترمیم کنند و سپس دوباره آن‌ها را به بدن بازگردانند، تعداد بسیار کمی از این سلول‌ها زنده می‌مانند. ویرایش ژنتیکی هم مثل تکنیک انتقال ژن با چالش‌های زیادی روبه‌رو است. محققان باید روش‌هایی پیدا کنند تا کریسپر به‌طور مؤثر در بافت‌های بدن یک فرد کار کند.

یکی از مهم‌ترین ریسک‌های کریسپر که به‌وفور درباره‌ی آن بحث می‌شود، آنزیم Cas9 است. این آنزیم باید قسمت خاصی از توالی DNA را برش دهد، اما ممکن است در قسمت‌های دیگری از ژنوم هم شکاف ایجاد کند که می‌تواند به جهش های ژنتیکی و افزایش احتمال ابتلا به سرطان منجر شود. محققان به‌دنبال این هستند که دقت کریسپر را افزایش دهند.

کریسپر- کَس ۹ توانایی بالایی برای درمان طیف وسیعی از بیماری‌های دارای زمینه ژنتیکی مانند سرطان، هپاتیت ب، کلسترول بالا و غیره را دارد. بسیاری از ابزارهای دیگر برای اصلاح ژن در ژنوم سلول‌های سوماتیک بکار برده می‌شدند درحالی‌که این سیستم در مورد اصلاح ژن در سلول‌های زایشی نیز کاربرد دارد. اهمیت اصلاح ژن در سلول‌های زایشی در این است که تغییر در ژن آن‌ها به نسل‌های آینده نیز منتقل می‌شود که این مسئله دارای پیامدهای اخلاقی مهم می‌باشد.

انجام اصلاح ژنی در سلول‌های زایشی در حال حاضر در انگلستان و در بیشتر دیگر کشورها غیرقانونی می‌باشد. در مقابل، استفاده از کریسپر- کَس ۹ و دیگر تکنولوژی‌ها برای ایجاد ویرایش ژن دارای مناقشه است. درواقع در حال حاضر برای درمان بیماری‌های انسانی در موارد خاص و یا مواردی که زندگی‌شان در خطر بوده است استفاده شده‌است.

منابع:

http://bio1.ir/blag/biotech/201-crispr.html

http://tragene.strc.ac.ir/index.php/scientific-blog/209-what-is-crispr

https://news.emory.edu/stories/2019/07/weiss_cas9_virulence_molcell/index.html

ALI, Z., ABUL-FARAJ, A., PIATEK, M. & MAHFOUZ, M. M. 2015. Activity and specificity of TRV-mediated gene editing in plants. Plant signaling & behavior, 10, e1044191.

FAUSER, F., SCHIML, S. & PUCHTA, H. 2014. Both CRISPR/C as-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in A rabidopsis thaliana. The Plant Journal, 79, 348-359.

HILBECK, A., MEIER, M., RÖMBKE, J., JÄNSCH, S., TEICHMANN, H. & TAPPESER, B. 2011. Environmental risk assessment of genetically modified plants-concepts and controversies. Environmental Sciences Europe, 23, 13.

TOHIDFAR, M. & KHOSRAVI, S. 2015. Transgenic crops with an improved resistance to biotic stresses. A review. BASE.

WOO, J. W., KIM, J., KWON, S. I., CORVALÁN, 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. Nature biotechnology, 33, 1162.

XING, H.-L., DONG, L., WANG, Z.-P., ZHANG, H.-Y., HAN, C.-Y., LIU, B., WANG, X.-C. & CHEN, Q.-J. 2014. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. BMC plant biology, 14, 327.

XU, R.-F., LI, H., QIN, R.-Y., LI, J., QIU, C.-H., YANG, Y.-C., MA, H., LI, L., WEI, P.-C. & YANG, J.-B. 2015. Generation of inheritable and "transgene clean" targeted genome-modified rice in later

YIN, K., HAN, T., LIU, G., CHEN, T., WANG, Y., YU, A. Y. L. & LIU, Y. 2015. A geminivirus-based guide RNA delivery system for CRISPR/Cas9 mediated plant genome editing. Scientific reports, 5, 14926.

Whitworth, K.M. et al. Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Nat. Biotechnol. 34, 20–22 (2016).

Carlson, D.F. et al. Production of hornless dairy cattle from genome-edited cell lines. Nat. Biotechnol. 34, 479–481 (2016).

Peng, J. et al. Production of human albumin in pigs through CRISPR/Cas9-mediated knockin of human cDNA into swine albumin locus in the zygotes. Sci. Rep. 5, 16705 (2015).

Ricroch, A.E. & Hénard-Damave, M.C. Next biotech plants: new traits, crops, developers and technologies for addressing global challenges. Crit. Rev. Biotechnol. 36, 675–690 (2016).

Li, Z. et al. Cas9-guide RNA directed genome editing in soybean. Plant Physiol. 169, 960–970 (2015).

Selle, K. & Barrangou, R. CRISPR-based technologies and the future of food science. J. Food Sci. 80, R2367–R2372 (2015).

Barrangou, R. et al. Genomic impact of CRISPR immunization against bacteriophages. Biochem. Soc. Trans. 41, 1383–1391 (2013).

Barrangou, R. & Horvath, P. CRISPR: new horizons in phage resistance and strain identification. Annu. Rev. Food Sci. Technol. 3, 143–162 (2012).

van Pijkeren, J.P. & Britton, R.A. Precision genome engineering in lactic acid bacteria. Microb. Cell Fact. 13 (Suppl. 1), S10 (2014).

Long C, Amoasii L, Mireault AA, McAnally JR, Li H, Sanchez-Ortiz E, Bhattacharyya S, Shelton JM,Bassel-Duby R, Olson EN. Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. Science. 2015 Dec 31. pii: aad5725. PubMed PMID 26721683