

Fakulteten för landskapsarkitektur, trädgårds-  
och växtproduktionsvetenskap

# CRISPR-Cas9 som ett nytt växtförädlingsverktyg

CRISPR-Cas9 a new plant breeding tool

*Oskar Swälas*



Självständigt arbete • 15 hp

Alnarp 2017

# CRISPR-Cas9 som ett nytt växtförädlingsverktyg

Crispr-Cas9 a new plant breeding tool

*Oskar Swälas*

**Handledare:** Mariette Andersson, SLU, Institutionen för växtförädling

**Btr handledare:** Per Hofvander, SLU, Institutionen för växtförädling

**Examinator:** Li-Hua Zhu, SLU, Institutionen för växtförädling

**Omfattning:** 15 hp

**Nivå och fördjupning:** G2E

**Kurstitel:** Kandidatarbete i biologi/molekylärbiologi

**Kurskod:** EX0493

**Utgivningsort:** Alnarp

**Utgivningsår:** 2017

**Omslagsbild:** M. Martinsson, Naturfotograferna och IBL.

**Elektronisk publicering:** <http://stud.epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** CRISPR, Cas9, GM, GMO-lagstiftning, genomitering, växtförädling

SLU, Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för landskapsarkitektur, trädgårds- och växtproduktionsvetenskap

Institutionen för biosystem och teknologi

## **Förord**

Jag vill tacka min handledare Mariette Andersson som har gett mig ett otroligt stöd under mitt skrivande. Hennes positivitet och snabba svar på e-mail har verkligen underlättat och hade det inte varit för henne så kunde det här arbetet ha blivit uppskjutet. Vill även tacka min familj för att ha funnits där som ett bollplank. Bollen kanske inte alltid studsade tillbaka men det var skönt att få ur sig sina tankar om arbetet.

## **Sammanfattning**

Inom växtförädlingens värld så gör man nya framsteg i rasande takt. Teknikutvecklingen går så snabbt att lagstiftning och regleringar inte hänger med.

Detta gäller inte bara i Sverige utan även resten av världen. Jag har därför försökt reda ut situationen genom att samla information gällande nuvarande regleringar och genom att ta reda på vilka som tar dessa beslut.

Fokus ligger på CRISPR-Cas9 som växtförädlingsmetod då denna har väckt extra stort intresse både nationellt och internationellt, bland annat eftersom det idag, i många länder, är oklart om den kommer att hamna utanför de befintliga regleringarna kring GMO eller ej. Jag förklarar även CRISPR-Cas9 utförligt så att du som läsare ska kunna förstå möjligheterna men även riskerna med metoden. Förklaringen lägger även grund till varför metoden hamnar utanför lagsystemet.

## **Abstract**

New progress is being made within the area of plant breeding every day and it is happening quickly. New technologies are developing so fast that there have been difficulties in adjusting the laws and regulation.

This does not just apply to Sweden but also to the rest of the world. That is why an investigation has been started by me where my purpose is to collect information regarding the current regulations and who makes them.

My focus is on CRISPR-Cas9 as a plant breeding method since it has raised a national and international interest since it is, in many countries, unclear if it will be falling inside or outside the current GMO-regulations. The CRISPR-Cas9 method is also being explained thoroughly so that the reader will be able to understand both the opportunities and the risks. This explanation also serves to tell why the method is placed outside the law.

## Innehållsförteckning

Förord.....	1
Sammanfattning.....	2
Innehållsförteckning.....	3
Förkortningar.....	3
Introduktion.....	4
Syfte.....	5
Material och metod.....	5
Resultat.....	6
Diskussion.....	14
Källor.....	15

## Förkortningar

CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

GMO: Genmodifierad Organism

PAM: Protospacer Adjacent Motif

USDA: United States Department of Agriculture

EPA: Environmental Protection Agency

FDA: US Food and Drug Administration

## Introduktion

Dagligen görs nya framsteg på alla tekniska fronter och dess användningsområden blir allt fler och fler. Vi får nya möjligheter att utvecklas, fler sätt att ta oss fram på, begränsningar blir till plattformar att ta sats från och vi tar mer kontroll över det vi har. Med kontroll så handlar det om att kunna ha makt över vår planet och till dess hjälp har vi bland annat genmodifiering.

Med hjälp av genmodifiering kan människan rikta en del av både djurens och växternas genuppbyggnad, genotyp. Vi kan förändra hur de ser ut och fungerar, fenotyp. Genmodifieras en organism så kallas den för genmodifierad organisme, GMO. Redan i början av 1970-talet (Shireen, 2013) så kom forskare på idén med GMO och arbetet påbörjades direkt med denna revolutionerande teknik.

I det här arbetet kommer jag att fokusera på en ny gren av genmodifiering, nämligen CRISPR-Cas9 . Men vad är då CRISPR-Cas9? Förkortningen står för Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats och ett CRISPR associerat protein, Cas9. Det är en teknik som kan användas på lite olika sätt, vilka jag kommer att gå in på mer i detta arbete samt utveckla dess möjlighetsområden men den har sitt ursprung i bakteriellt försvarsmekanism. Tekniken kan komma att bli mer strikt reglerad än vad traditionell genmodifiering är. Tekniken är väldigt aktuell, dock är det inte många som känner till den och just därför har jag valt att belysa den i detta arbete genom att förklara hur den fungerar, hur den uppstod, dess framtid och hur den är reglerad i olika delar av världen. För att begränsa uppsatsen så kommer den att fokusera på genmodifiering av växter. Där är den etiska diskussionen inte på långa vägar lika omfattande som kring genmodifieringen av djur. Växtförädling tar upp en stor del av diskussionen inom hållbar utveckling, som är mitt biområde inom min utbildning, och just därför väljer jag att inte fokusera på djurens sida.

## **Syfte**

Syftet med det här arbetet är att upplysa och informera de som är intresserade om vad som sker, har skett och eventuellt kommer att ske gällande CRISPR-Cas9 men även ge läsaren en bild av hur det ser ut på olika håll i världen och även varför det ser ut som det gör. Jag hoppas att läsaren ska kunna bilda sig en egen uppfattning om CRISPR-Cas9's möjligheter men även risker. Kanske det även öppnar upp ögonen för någon läsare och får denne till att själv ge sig in i genmodifieringens spännande värld.

## **Material och metoder**

Det här är en litteraturstudie som är uppbyggd av olika aktuella källor. Materialet plockades ifrån olika källor så som internetsidor, publikationer, lagtexter och föreläsningmaterial.

## Resultat

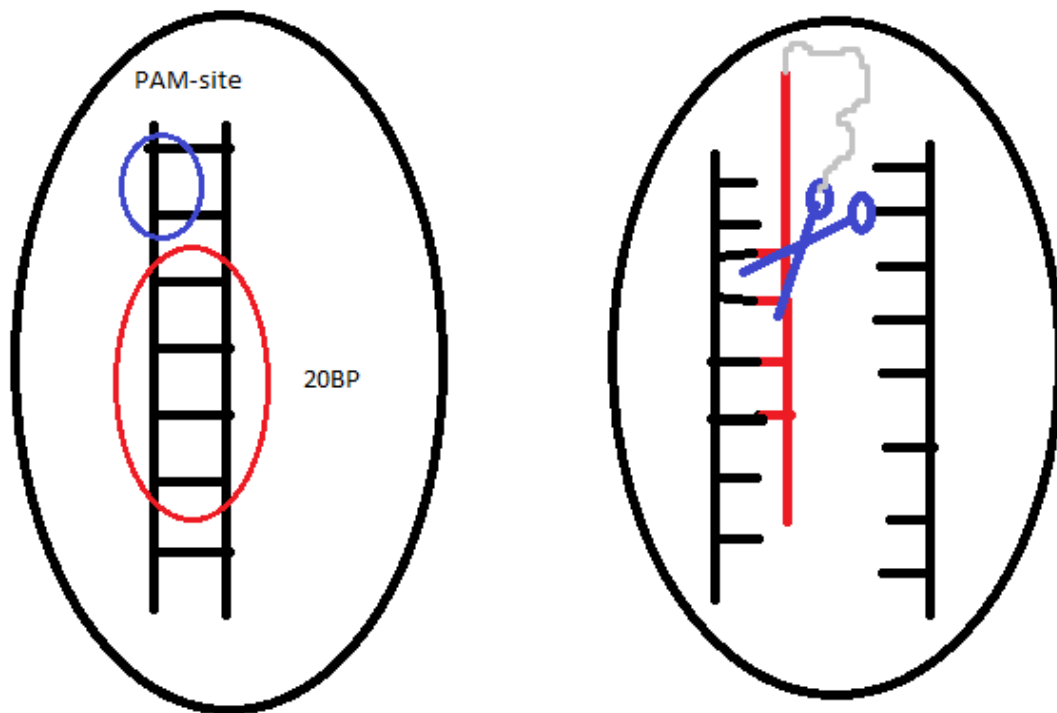
### Hur CRISPR-Cas9 fungerar

Tekniken baseras på en försvarsmekanism som förekommer naturligt i bakterier och är en kombination av ett RNA och ett protein. Komplexet har som funktion att skydda bakterien från virus genom att påskynda nedbrytningsprocessen av virus. Proteinet har givits namnet Cas9 och RNA kallas guide-RNA (gRNA). I detta komplex fungerar Cas9 som en sax och gRNA som en guide. Med hjälp av detta komplex kan gRNA hitta den specifika sekvensen av en målgen (DNA) och binda till den. Det gRNA/DNA-komplexet kan sen klippas av Cas9-proteinet (Voytas & Gao, 2014). Proteinet kan nu låta uttryckas i en växtcell, alternativt kan enzymer produceras extracellulärt och sedan användas i växtceller.

### Modifiering av genuttryck genom CRISPR-Cas9

Först letar man reda på en sekvens, som uppfyller ett antal kriterier, i den gen man vill modifiera. Sekvensen ska vara 20 baspar och storlekstolleransen är snäv på enbart någon enstaka bas. Den ska även ha en ände utanför dessa med kodningen "-NGG". Sekvensen "-NGG" kallas för ett PAM-site (protospacer adjacent motif) och har som uppgift att förhindra att den utvalda sekvensen för CRISPR ska förstöras av nukleaset. Utan PAM-siten kan heller inte Cas9 binda in ordentligt till DNA-strängen. När den gen som ska muteras har valts ut så designas en målsökande sekvens. Det är alltså den sekvens på 20 baspar som sitter vid PAM-siten. Cas9 och sekvensen bildar då ett komplex som nu lokaliserar till genen med målsekvensen och klipper i kromosomen, det vill säga den DNA-dubbelsträngen som vi förbestämt ska få en mutation.



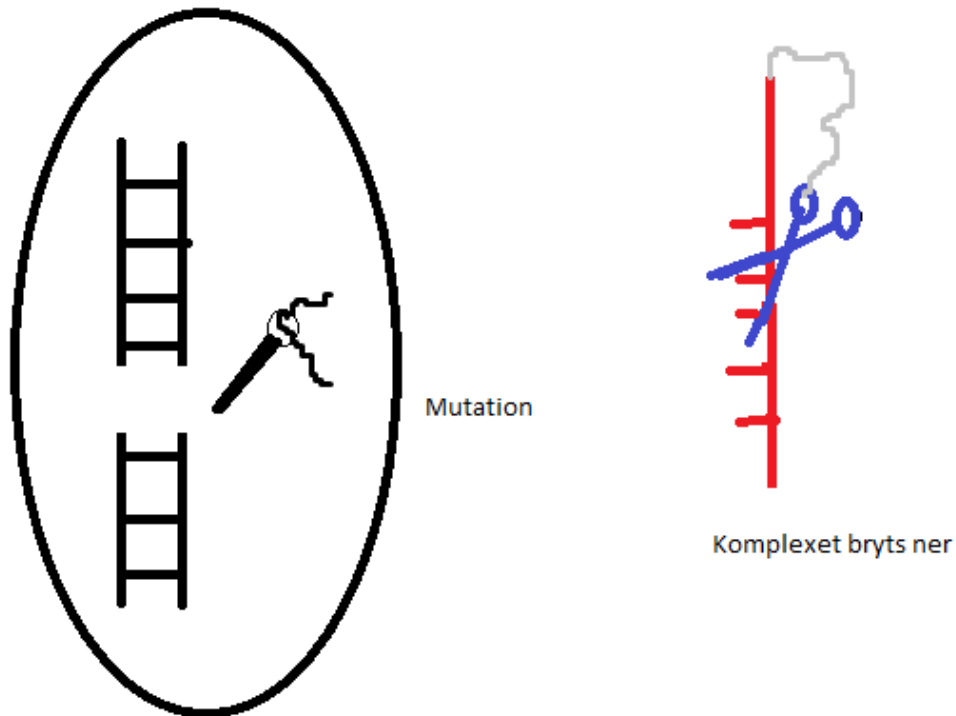


Figur 1. Två växtceller där antalet baspar visas tillsammans med den sammanhängande PAM-siten samt hur komplexet binder in till DNA-strängen.

Cellen inser att en skada har skett och försöker sedan lappa ihop det brott som har skett i DNA-kedjan men under reparationen så sker ofta fel. Ibland blir det helt enkelt fel vid reparationen och baspar ramlar bort eller läggs till. Då kan läsramen förskjutas och genen kommer att läsas av helt annorlunda och resultera i ett avkortat eller ett ej fungerande protein. En mutation har då skett.

### Är CRISPR-Cas9 GMO eller inte?

Denna teknik kan användas på ett sätt att den modifierade plantan eventuellt inte kommer att regleras som en GMO. Det som då gör att inte växten räknas som en reglerad GMO-gröda efter den här processen är att man använder Cas9 och målsekvensen på ett sätt som gör att det man har skickat in kommer att brytas ned.



Figur 2. Cellen reparerar sin DNA-sträng men mutationer sker. Komplexet av enzym och målsökande sekvens bryts ner.

Inget nytt DNA stoppas in i växtens genom utan det har bara fått den att börja reparera sig på ett specifikt ställe genom att tvinga den till att göra just detta. Detta kan ske genom att man uttrycker CRISPR-Cas9 kodande DNA tillfälligt (transient) i en cell eller att man bildar CRISPR-Cas9 protein-RNA komplexet extracellulärt innan det sätts in tillfälligt i en cell. Cellen fortsätter att dela på sig och kan sen delas upp på en agarplatta för att eventuellt bilda skott. Varje cell i skottet besitter samma mutation och på så vis har man påskyndat ett naturligt förlopp. Från det här steget kan sedan skotten väljas ut med den egenskap som har eftersökts. Man kan även sätta in CRISPR-Cas9 stabilt i växtens genom och efter mutationen/mutationerna har inducerats, korsa ut insertet. Inte heller här lämnat något nytt DNA kvar i plantan. (Andersson, 2016).

Ett alternativ till att låta växten slumpmässigt laga brottet är att man för in en mall i cellen som sedan används för att reparera brottet. På så vis kan man bestämma vilken genetisk kod som ska stå skriven. Även om denna metod används så behöver inte växten räknas som en GMO-gröda, till exempel om inga större fragment sätts in i genomet, om mallen bryts ned eller korsas ut. Detta öppnar även upp möjligheten till att skraddarsy ett protein för att få andra egenskaper. (Andersson, 2016)

Den här tekniken är framgångsrik, beroende på växtslag, på att vara ekonomisk och framförallt snabb, både att genomföra samt när det kommer till att ha igång flera mutationer samtidigt (Anonym, 2016). Det finns företag som idag säljer producerat Cas9 protein. Beroende på vilken mängd som ska

inköpas så varierar priset. Ett Cas9 nukleas på 10 mikrogram kostar runt 1500kr och ett kit för att producera 20 bp målsökande RNA sekvens kostar ca 4000kr. (ThermoFisher Scientific, 2015).

### **Vad har CRISPR-Cas9 för användningsområde?**

CRISPR-Cas9-tekniken har testats eller etablerats ibland annat ris (Shan et al., 2013), vete (Zhang et al., 2016) korn och kål (Lawrensen et al., 2014). De resultat som forskare försöker att ta fram bland olika grödor kan vara till exempel resistans mot ohyra eller sjukdomar, ökad olerans mot bekämpningsmedel, mer frukt från en växt och så vidare.

Som ett exempel på användningsområde så har SLU under 2016 lyckats ta fram en förädlad potatis som klarar lagring bättre. Den vill användas för att producera stärkelse och skulle på grund av denna egenskap bli ett mer hållbart alternativ på marknaden. (Andersson et al., 2016)

### **Så hur skiljer sig CRISPR-Cas9 mot vissa andra växtförädlingstekniker?**


Skillnaderna mellan växter som har modifierats med CRISPR-Cas9 och med verktyg som används inom annan växtförädling är egentligen inte så stor. Tittar man bara på resultatet så kan de faktiskt vara likadana. Det är bara tillvägagångssättet fram till resultatet som skiljer dem åt. Det finns flera tekniker man kan använda (Figur 3.) och vissa av dem förklaras lite kort nedan.

# Crop Modification Techniques

**BIOLOGY FORTIFIED**

## Cross Breeding


Combining two sexually compatible species to create a variety with the desired traits of the parents



The Honeycrisp Apple gets its famous texture and flavor by blending the traits of its parents.

## Mutagenesis

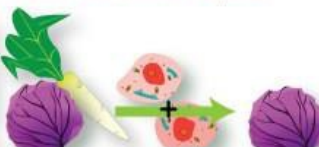
Use of mutagens such as radioactivity to induce random mutations, creating the desired trait



Radiation was used to produce a deeper color in the red grapefruit.

## Protoplast Fusion


Fusion of cells or cell components to transfer traits between species



Male sterility is transferred from radishes to red cabbage by fusing their cells. Male sterility helps plant breeders make hybrid crops.

## Polyploidy


Multiplication of the number of chromosomes in a crop to impact its fertility



Seedless watermelons are created by crossing a plant with 2 sets of chromosomes with another that has 4 sets. The seedless fruit has 3 sets.

## Genome Editing


Use of an enzyme system to modify DNA directly within the cell



Genome editing was used to develop herbicide resistant canola to help farmers control weeds.


## Transgenesis

Addition of genes from any species to create a new variety with desired traits



The Rainbow Papaya is modified with a gene that gives it resistance to the Papaya Ringspot Virus.

[www.biofortified.org](http://www.biofortified.org)

Follow us on Twitter (@frankfoode) or join our Facebook Page  
By Layla Katriase (@BiochicaGRAC) in collaboration with Karl Haro von Mogel (@khrvm)  
Shared under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0 License  
2015 Biology Fortified, Inc. 

Figur 3. Olika växtförädlingstekniker (Haro von Mogel, 2015).

Selektion kan sägas vara grunden till all växtförädling. Det går ut på att man bara använder sig av de mest eftertraktade växterna för att sedan odla upp nästkommande generationer så att de behåller dessa egenskaper.

Naturliga mutationer sker hos växterna och vissa av dem kan ge unika egenskapsuttryck som både kan vara värda att spara eller som är negativa för plantan. Dessa mutationer kan starkt förknippas med evolution. (DeJohn, 2016)

Korspollinering går till så att man tar två plantor som har de önskade egenskaperna. Sedan korsar man dessa genom att föra över pollen från den ena plantan till den andra. Syftet är då att sammanföra önskvärda egenskaper i avkomman.

Inducerade mutationer är ytterligare ett verktyg som används inom traditionell växtförädling. Här tar man hjälp av antingen kemikalier, bestrålning eller transposoninfogning för att få växtens genom att tvingas till att muteras. På så

vis kan mutationerna slumpas fram tills en önskad egenskap fås. (McClellan, 1999).

Det unika och omdiskuterade inom traditionell GMO är att man kan sätta in gener från en art in i en helt annorlunda art för att få fram andra genuttryck. Det här är något som väldigt sällan sker naturligt. Även här finns flera olika metoder (Antoniou, Robinson, and Fagan, 2012).

DNA kan transformeras i en växtcells genom med hjälp av en jordbakterie, *Agrobacterium tumefaciens*. Man kan även använda sig av en genpistol eller genkanon för att "skjuta" in DNA rakt in i cellen (Antoniou, Robinson, and Fagan, 2012).

### **Hur ser regleringen ut i världen?**

Möjligheterna men även riskerna är många med genmodifierade organismer kan anses vara många med en så här bred teknik. Därför finns en mängd regleringar kopplade till tekniken. När det kommer till CRISPR-Cas9 så ser det dock väldigt olika ut bland dessa lagar beroende på vart man befinner sig i världen. En jämförelse kommer därför att göras för att försöka reda ut hur det ser ut men även varför det är på det viset.

Sverige tillhör EU och måste därför anpassa sig efter EU-kommissionens beslut. Just nu finns ingen beslutad EU-reglering angående CRISPR-Cas9 eller andra genomediteringsmetoder som inte leder till någon stabilt införande av DNA. På senare tid har EU-kommissionen jobbat för att få fram ett beslut då de direktiv som finns just nu angående GMO upprättades på 1990-talet. Ett sådant gammalt direktiv i ett ämne som utvecklas konstant och snabbt gör att det i dagens läge är både svårtolkat och föråldrat. Det gör att Jordbruksverket, som nu tar de svenska besluten kring GMO-växter, får det svårt att applicera regelverket på de genomeditering växter som tas fram idag. Eftersom CRISPR-Cas9 är en växtförädlingsteknik som i många fall handlar om att skapa mutationer utan att kvarlämna något främmande DNA kvar i cellerna så kan man tolka lagtexten som att tekniken hamnar utanför regelverket. (Jordbruksverket, 2015)

Diskussionen tog fart på allvar när man på två universitet i Sverige gjorde förfrågan där man utmanade Jordbruksverket att ta ställning. En genommodifierad planta av arten backtrav (*Arabidopsis thaliana*) (Figur 4.) togs fram genom att GMO användes i ena fallet och CRISPR-Cas9 i det andra. Jordbruksverket tog då beslutet att GMO-plantan behöver tillstånd för att få användas i fältförsök och försöksodling medan det blev fritt fram att odla CRISPR-plantan utan något speciellt tillstånd fast de båda plantorna besitter samma egenskaper. Skillnaden är alltså hur man har gått tillväga för att göra det. Detta skapar diskussionspunkter om en reglering bör gälla tillvägagångssättet eller resultatet. (Jordbruksverket, 2015)



Figur 4. Backtrav (*Arabidopsis thaliana*) i det vilda (Martinsson, Naturfotograferna, and IBL, 2011).

I ett pressmeddelande från EU-kommissionen från 2015 så kom det fram att endast två av de GM-produkter som framtagits ingår under GMO-lagarna. (EU-kommissionen, 2015)

I miljöbalkens 13:e kapitel så beskrivs en GMO efter två paragrafer:

3 § Med organism avses en biologisk enhet som kan föröka sig eller föra över genetiskt material.

4 § Med genetiskt modifierad organism avses en organism hos vilken det genetiska materialet har ändrats på ett sätt som inte inträffar naturligt genom parning eller naturlig rekombination. (Sjöström, 2006)

Allt det här fallerar just när den framställda grödan inte har något främmande genetiskt material i sig.

För att tillåtas på USA:s marknad så krävs det att United States Department of Agriculture (USDA) tillsammans med Environmental Protection Agency (EPA) och US Food and Drug Administration (FDA) utvärderar om den kan tillåtas. Det jobbas aktivt med regleringen av CRISPR-Cas9 i USA. Även fast det är ett flertal instanser av kontroller så har de svårt att säga nej till genommodifierade växter som skapats med hjälp av till exempel CRISPR-Cas9. Detta på grund av att modifiering inte lämnar något främmande DNA kvar i växtcellerna. Senast i april 2016 så gav USDA ett positivt utlåtande åt en ny sorts majs och en omdiskuterad svamp. Svampen blev omdiskuterad då den var modifierad. Den är en vanlig vit knappsvamp (*Agaricus bisporus*) som modifierats så att den inte ska bli brun. Även fast den inte går under samma rike som växter så lyder den under samma GM-regleringar i USA. (Waltz, 2016)

Media skrev mycket om händelsen kring svampen då det under samma månad hade uppmärksammats att man hade börjat använda CRISPR-Cas9 för forskning på mänskliga embryon. Efter det oron kring genmodifieringar

växt och i samband med den snabba användningen av metoden så bearbetas regleringen kring bland annat CRISPR-Cas9. Under mitten av 2016 så påbörjades ett större arbete hos USDA där de ska besluta om en ny regleringar av GM-produkter. (Hoffman, 2016)

Nedan följer en kort sammanställning av hur några andra länder förhåller sig till genomediteringstekniker som inte regleras som GMO (Tabell 1.). Dessa tekniker kallas även för "new breeding techniques" (NBTs).

Tabell 1. Kort sammanfattning av NBT-regleringen för några länder.

Land	Reglering
Argentina	Utreder varje fall för sig.
Australien	Grödor med en eller få borttagna DNA-bitar regleras inte men de med insatta gener görs.
Japan	Räkns inte grödan som transgenisk så regleras den inte.
Kanada	Skiljer inte på GM eller non-GM. Omfattas redan av sin nationella lagstiftning och reglering.
Nya Zeeland	Alla NBT-grödor är reglerade.
Sydafrika	Har påbörjat visa intresse för en reglering av NBT-grödor men hade 2015 bara påbörjat förhandlingarna.
Sydkorea	Ingen reglering av NBT finns men kommer en GM-produkt in så hanteras den fall för fall.

(Ledford, 2016) (Schuttelaar et al., 2015)

## Diskussion

Utifrån resultaten i den här undersökningen så har ett flertal frågor vuxit fram som är starkt kopplade till mitt syfte.

Vad finns det för skillnader och likheter mellan lagstiftningarna mellan olika länder?

Bör teknikerna vara det som är reglerat eller bör man inkludera eller exkludera resultat och delar av tekniken?

Vilka kan vara anledningarna till varför inte EU-kommissionen har släppt en slutsats eller reglering som gäller för hela EU?

I mitt arbete har jag nämnt hur regleringen av CRISPR-Cas9, ser ut mellan huvudsakligen Sverige och USA men även med EU i tankarna. De båda ser ut att ha haft det svårt att hinna med GM:s teknikutveckling då regleringarna har kommit sent eller inte alls. I Sverige är det idag fritt fram att provodla CRISPR-Cas9-modifierade växter under specifika förutsättningar (inget nytt DNA introducerats) som tagits fram av Jordbruksverket. Det kan vara så att de vill att tyglarna på GMO ska släppas lite då de har lyckats bevisa för Jordbruksverket att tekniken man använder inte spelar någon större roll för resultatet. Just det här väcker även en annan fråga om en reglering ska vara på tekniken, egenskapen, båda eller inget av de tidigare nämnda. Samtidigt kan dessa delas upp i fler regleringsområden. Australien har riktat in sig på delar av hur det går till medan till exempel Argentina tittar på varje fall för sig för att sedan ta ett beslut. Personligen kan jag tycka att resultatet eller egenskapen är det som bör vara reglerat så länge vägen dit är etiskt korrekt. Precis som USDA anser så är det väldigt viktigt med skyddsåtgärder när man planterar ut en GM-gröda så att ekosystemet inte rubbas på något sätt och för att bevara de arter som redan finns. Det är antagligen den här frågan som EU-kommissionen funderat på allra mest. Här ligger alltså USA men även vissa länder i Europa aningen före både Sverige och EU.



## Källor

Andersson, Mariette; forskare Växtförädling vid Sveriges Lantbruksuniversitet inom Avdelningen för Växtförädling. 2016. Föreläsning 2 december.

Andersson, M., Turesson, H., Nicolia, A., Fält, A.-S., Samuelsson, M. and Hofvander, P. (2016) 'Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts', *Plant Cell Reports*, 36(1), pp. 117–128. doi: 10.1007/s00299-016-2062-3.

Anonym (2016) *CRISPR/Cas Nuclease RNA-guided genome editing*. Tillgänglig på: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/crispr-cas9-genome-editing.html?gclid=Clfz6rPUntACFUpJGQodAGcMCQ> (Åtkommen: 30 november 2016).

Antoniou, M., Robinson, C. and Fagan, J. (2012) *GMO Myths and Truths*, sida 9. Tillgänglig på: [https://xgmo.files.wordpress.com/2012/09/gmo\\_myths\\_and\\_truths\\_1-31.pdf](https://xgmo.files.wordpress.com/2012/09/gmo_myths_and_truths_1-31.pdf) (Åtkommen: 10 december 2016).

DeJohn, S. (2016) *How genetic engineering differs from traditional plant breeding*. Tillgänglig på: <http://www.gardeners.com/how-to/genetic-engineering-traditional-plant-breeding/7926.html#> (Åtkommen: 09 december 2016).

EU-kommissionen (2015) *Commission authorises 17 GMOs for food/feed uses and 2 GM carnations*. Tillgänglig på: [http://europa.eu/rapid/press-release\\_IP-15-4843\\_en.htm](http://europa.eu/rapid/press-release_IP-15-4843_en.htm) (Åtkommen: 17 december 2016).

Haro von Mogel, K. (2015) *Biofortified*. Tillgänglig på: <https://i2.wp.com/www.biofortified.org/wp-content/uploads/2015/07/Crop-Modification-Techniques-Vertical-HQ.jpg?w=612> (Åtkommen: 26 december 2016).

Hoffman, S. (2016) *CRISPR: The GMO technology that needs no regulation, says USDA*. Tillgänglig på: <https://www.organicconsumers.org/news/crispr-gmo-technology-needs-no-regulation-says-usda> (Åtkommen: 17 december 2016).

Jordbruksverket (2015) *Svar om ny teknik ger GMO eller inte*. Tillgänglig på: <http://www.jordbruksverket.se/pressochmedia/nyheter/nyheter2015/svaromny-vaxtforadlingsteknikgergmoellerej.5.3eaa64c21510f7c86771c715.html> (Åtkommen: 17 december 2016).

Lawrenson, T., Shorinola, O., Stacey, N., Li, C., Østergaard, L., Patron, N., Uauy, C. and Harwood, W. (2015) 'Induction of targeted, heritable mutations in barley and Brassica oleracea using RNA-guided Cas9 nuclease', *Genome biology*, 16.

Ledford, H. (2016) 'Gene-editing surges as US rethinks regulations', *News*, 532(7598), sid. 158. doi: 10.1038/532158a.

Martinsson, M., Naturfotograferna and IBL (2011) *Allt om vetenskap*.

Tillgänglig på:

<http://www.alltomvetenskap.se/sites/default/files/styles/large/public/plantor.jpg?itok=og2rml8n> (Åtkommen: 22 december 2016).

McClellan, P. (1999) *Genes and mutations - spontaneous and induced mutations*. Tillgänglig på:

<https://www.ndsu.edu/pubweb/~mcclellan/plsc431/mutation/mutation3.htm> (Åtkommen: 10 december 2016).

Schuttelaar et al. (2015) *Nbtplatform*. Tillgänglig på:

<http://www.nbtplatform.org/background-documents/rep-regulatory-status-of-nbts-oustide-the-eu-june-2015.pdf>, sid. 19, 34 och 36. (Åtkommen: 2 januari 2017).

Shan, Q., Wang, Y., Li, J., Zhang, Y., Chen, K., Liang, Z., Liu, J., Xi, J., Qiu, J. and Gao, C. (2013) 'Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system', *Nature biotechnology*, 31(8), pp. 686–8.

Sjöström, A.-C. (2006) *Genvägen genteknik myndigheter lagstiftning gmo gmm genetiskt modifierad*. Tillgänglig på:

<http://www.gmo.nu/toppmeny/bestammelserochansvar/definitionavgmo.4.1d07c3f108381dd74480001168.html> (Åtkommen: 17 december 2016).

Inc, T.F.S. (2015) *CRISPR products and services*. Tillgänglig på:

[https://www.thermofisher.com/se/en/home/life-science/genome-editing/geneart-crispr.html?gclid=CJXAgZOU6tACFQxeGQod1NMFra&s\\_kwid=AL!3652!3!118177162641!p!!g!!cas9&mkwid=sNLRJ6ziN-dc\\_pcrd\\_118177162641\\_pkw\\_cas9\\_pmt\\_p\\_slid\\_\\_dimid=&ef\\_id=WBo55AAAACkqk0NI:20161210173248:s#1](https://www.thermofisher.com/se/en/home/life-science/genome-editing/geneart-crispr.html?gclid=CJXAgZOU6tACFQxeGQod1NMFra&s_kwid=AL!3652!3!118177162641!p!!g!!cas9&mkwid=sNLRJ6ziN-dc_pcrd_118177162641_pkw_cas9_pmt_p_slid__dimid=&ef_id=WBo55AAAACkqk0NI:20161210173248:s#1) (Åtkommen: 09 december 2016).

Shireen (2013) *GMO Timeline: A history of genetically modified foods*.

Tillgänglig på: <http://gmoinside.org/gmo-timeline-a-history-genetically-modified-foods/> (Åtkommen: 18 november 2016).

Voytas, D.F. och Gao, C. (2014) 'Precision genome engineering and agriculture: Opportunities and regulatory challenges', *PLoS Biology*, 12(6), p. e1001877. doi: 10.1371/journal.pbio.1001877.

Waltz, E. (2016) 'Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation', *News*, 532(7599), sid. 293. doi: 10.1038/nature.2016.19754.

WHO (inget datum) *World Health Organisation*. Tillgänglig på:

[http://www.who.int/foodsafety/areas\\_work/food-technology/faq-genetically-modified-food/en/](http://www.who.int/foodsafety/areas_work/food-technology/faq-genetically-modified-food/en/) (Åtkommen: 10 december 2016).

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