



Derleme / Review article

CRISPR/Cas9 teknolojisi ve gıda alanında kullanımı

Aysegul Bolukbas^{*1} , Ali Gucukoglu¹ 

¹ Ondokuz Mayıs University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Food Hygiene and Technology, 55200, Samsun, Turkey

Öz

Artan dünya nüfusu ile birlikte, tarıma elverişli araziler azalmakta ve buna bağlı olarak gıda güvenliğine ilişkin endişeler artmaktadır. Bu endişelerin önüne geçmek için moleküler ıslah yöntemlerinin yanı sıra modern biyoteknolojik araçlarında kullanılması gerekmektedir. CRISPR/Cas9, bölgeye özgü nükleaz enzimini kullanarak çift sarmallı kırılmalar oluşturan genom düzenleme yöntemidir. Çiftlik hayvanlarında hastalıklara karşı direnç oluşturulması, verim özelliklerinin yükseltilmesi, bakteriyofajlara karşı dirençli başlangıç kültürlerinin (starter kültürler) elde edilmesi, tıp alanında kanser türleri ve kalıtsal hastalıkların elemine edilmesi, tarım alanında kuraklık ve zararlılara karşı daha dirençli ve yüksek verimli bitkilerin yetiştirilmesi için kullanılmaktadır. CRISPR/Cas9 teknolojisinin yasal mevzuat çerçevesinde ve bilimsel araştırmalar kontrolünde gerçekleştirildiğinde yararlı olacağı düşünülmektedir. Ancak teknolojik uygulamaların toplum üzerinde kolay kabul görmemesi ve yöntemin kullanımı konusunda etik tartışmalar devam etmektedir.

Anahtar kelimeler: CRISPR/Cas9; CRISPR/GDO farkı; CRISPR teknoloji; genom düzenleme; gıda

CRISPR/Cas9 technology and usage in the food industry

Abstract

By the increase of world population, arable lands are decreasing and related to this, food security concerns are increasing. In order to avoid these concerns, it is necessary to use modern biotechnological tools and molecular breeding methods. CRISPR/Cas9 is a genome editing method that creates double-stranded breaks using the site-specific nuclease enzyme. This method is used for providing disease resistance in farm animals, increasing yield characteristics, obtaining starter cultures resistant to bacteriophages, eliminating cancer types and hereditary diseases in medicine, growing more resistant and high yielding plants against drought and pests in agriculture. In the field, it is used for the cultivation of high-yielding plants that are more resistant to drought and pests. It is thought that CRISPR/Cas9 technology will be useful when it is carried out within the framework of legal regulations and under the control of scientific research. However, ethical debates continue regarding the use of the method and the fact that technological applications are not easily accepted by the society.

Keywords: CRISPR/Cas9; CRISPR/GMO difference; CRISPR technology; food; genomic regulation

* Sorumlu yazar / Corresponding author.

E-mail: aysegul.korkmaz00@gmail.com (A. Bolukbas).

<https://doi.org/10.51753/flsrt.997899> Yazar katkıları / Author contributions

Geliş tarihi / Received 20 Eylül 2021 / 20 September 2021; Kabul tarihi / Accepted 08 Ocak 2022/ 08 January 2022

Çevrimiçi yayın / Available online 29 Nisan 2022 / 29 April 2022

2718-062X © 2022 This is an open access article published by Dergipark under the [CC BY](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) license.

1. Giriş / Introduction

Dünyada her geçen gün artan nüfusa bağlı olarak gıda arzı oluşmakta ve üretilen gıdalar bu ihtiyacı karşılamaya yetersiz kalmaktadır. Hayvansal gıdaların üretimi için yetiştirilen çiftlik hayvanlarının yetiştirme koşullarını etkileyen iklimsel farklılıklar, çevresel problemler ve bakım-besleme koşullarının değişkenliği sebebiyle adaptasyon güçlükleri meydana gelmekte ve buna bağlı olarak çeşitli hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Uzun yıllardan beri artan gıda ihtiyacını karşılamaya yönelik sorunların çözüme ulaşması için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır (Esen ve ark., 2020). Günümüzde tüketiciler, gıdaların açlığı gidermesinin yanı sıra hastalıkların önlenmesine de önemli katkılar sağladığına inanmakta, bu nedenle gıda endüstrisinin küresel ekonomi üzerindeki güçlü etkisinin katkısıyla tüketicilerin özel gereksinimlerini karşılamak için genom düzenleme tekniklerinin kullanıldığı yeni teknolojik uygulamalar ön plana çıkmaktadır (Bigliardi ve Galati, 2013; Ouyang ve ark., 2017; Es ve ark., 2019).

Canlı bir organizmanın sahip olduğu genomda çeşitli manipülasyonlar ile istenilen bir nükleotid dizisinin hedeflenen noktaya eklenmesine, istenilen noktadan çıkartılmasına ve yer değişikliği yapılmasına genom düzenleme (GD) denilmektedir (Proudfoot ve ark., 2015). Genom düzenleme çalışmaları 1991 yılında ZFN (Zinc Finger Nucleases-Çinko Parmak Nükleaz)'lerin keşfi ile başlamış, 2012 yılında TALEN (Transcription Activator Like Effector Nucleases-Transkripsiyon Etketör Benzeri Nükleazlar) tekniğinin ortaya çıkması ile artmış ve 2013 yılından itibaren çok daha kolay uygulanan ve maliyeti diğer uygulamalara göre daha düşük olan CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat - Düzenli Aralıklarla Bölünmüş Polindromik Tekrar Kümeleri/ CRISPR Associated) yöntemiyle devam etmiştir (Mali ve ark., 2013; Ruan ve ark., 2017; Ozyigit ve ark., 2021). Science dergisi 2015 yılında CRISPR yöntemini yılın buluşu seçerek bu yöntemin araştırmacılar için ilgi odağı olmasını ve çalışmalar yapmasını hızlandırmıştır. 2020 yılında Emmanuelle Charpentier ve Jennifer Doudna'nın "Genom düzenleme için bir yöntem geliştirmelerinden dolayı" Nobel Kimya Ödülünü alması ile CRISPR yöntemine olan ilgi tüm dünyada artmıştır (Ruan ve ark., 2017; Anonim, 2020).

CRISPR, bakterilerin savunma sistemlerinin araştırılmasıyla ortaya çıkmış olup, hücrelerdeki DNA yapısının değişime uğraması ile tıp alanında kalp hastalıkları, kanser türleri ve görme kaybına neden olan bazı kalıtsal hastalıkların tedavisinde yeni bir teknik olarak kullanılmıştır (Zhan ve ark., 2019; Luthra ve ark., 2021; Seok ve ark., 2021). Tarım ve gıda alanında ise yalnızca yüksek verimli bitkiler değil, aynı zamanda besin değeri yüksek, kuraklığa ve tarım zararlılarına karşı daha dayanıklı bitkilerin yetiştirilmesinde de kullanılabilir. Herbisit toleransı, böcek direnci, tane verimi, bitki boyu ve ağırlığı gibi temel agronomik özelliklerin yanı sıra, ürünlerin duysal ve besleyici özellikleri gibi agronomik olmayan özellikleri iyileştirilerek gıda endüstrisine önemli ölçüde fayda sağlamıştır (Es ve ark., 2019; Zhang ve ark., 2020).

Çiftlik hayvanlarında hastalıklara karşı direnci arttırmak ve buna bağlı olarak üretimi geliştirmek için genom düzenleme yöntemleri kullanılmaktadır (Proudfoot ve ark., 2015). CRISPR yöntemi embriyo transfer teknolojisi ile birleştirilerek hayvan ıslahında kullanılmakta, hayvansal ürünlerde verim ve kaliteyi artırmanın yanında hayvan refahında da artış ve hastalıklara karşı direnç sağlanmasına katkı sunmaktadır (Ruan ve ark., 2017; Esen ve ark., 2020).

Genomik seleksiyonlar, hastalıklara karşı direncin artırılmasını sağladığı gibi verimin artırılmasında da avantaj sağlamaktadır. Bu amaçla CRISPR/Cas9 sisteminin bu alanda kullanımı ile ilgili pek çok çalışma mevcuttur. Çalışmalarda hayvanlarda alerjiye sebep olan genin inaktive edilmesinden farelerin sperm kuyruklarının uzatılmasına, kolesterol seviyelerinin düşürülmesinden karaciğer kanser hücrelerinin azaltılmasına kadar birçok araştırma yapılmıştır (Ding ve ark., 2014; Xue ve ark., 2014; Veron ve ark., 2015; Young ve ark., 2015). CRISPR teknolojisinde kullanılan Cas9 proteininin çalışma prensibi üzerine yapılan araştırmalar bilim insanlarına yeni alanlarda çalışma fırsatları veren ve istenmeyen DNA parçalarının hücre içerisinden hassas bir şekilde çıkarılmasının yanında istenen özelliklerin DNA içerisine eklenmesini sağlayan bir yol olarak değerlendirilmektedir (Ruan ve ark., 2017). Bu derlemede birçok alanda araştırmaya ve geliştirmeye müsait olan CRISPR/Cas9 teknolojilerinden, çiftlik hayvanları ve hayvan sağlığında kullanımı ile gıda alanındaki uygulamalarından bahsedilecek ayrıca kullanımındaki avantajları, dezavantajları ve etik sorunları hakkında bilgi verilecektir.

2. CRISPR teknolojisi / CRISPR technology

Genom düzenleme, DNA üzerinde belirlenen alanlarda değişiklik ya da düzenlemeler yapılmasıdır. Hücrelerin genomlarında özelleşmiş DNA bölümlerinde hedeflenen değişiklikleri yapabilmek için tasarlanan genom düzenleme, hücre içerisindeki DNA'nın verimli ve hatasız şekilde değiştirilebilmesi için kullanılan bir tekniktir. Bu tekniğin yaygın olarak kullanılmasında ve araştırmacıların ilgi alanı haline gelmesinde özelleştirilebilme kolaylığı ve çoklu hücre tiplerinde uygulanması etkili olmuştur (Ruan ve ark., 2017). Genom düzenleme sistemi ile ilgili yapılan çalışmalarda ZFN ve TALEN sistemleri en çok bilinen ve kullanılan yöntemlerdendi (Deng ve ark., 2012). Bununla birlikte 2013 yılında CRISPR/Cas sistemi olarak tanımlanan, bakteriyel adaptif immün sistemi ve DNA bağlanma proteini yerine küçük rehber RNA bulunduran sistematik yapı üzerinde çok sayıda araştırma yapılmıştır (Cong ve ark., 2013; Hwang ve ark., 2013; Jinek ve ark., 2013; Cho ve ark., 2014).

CRISPR'dan önce kullanılan genom düzenleme araçları zor kullanımlı, uygulanması zaman alan ve maliyeti yüksek olan uygulamalardır. DNA çift zincir kırıklarının tamir etmeleri, gen delesyonu, gen insersiyonu, nokta mutasyonları ve kromozomların yeniden düzenlenmesi ZFN, TALEN ve CRISPR gibi programlanabilir nükleazların ortak özellikleridir (Mali ve ark., 2013). ZFN ve TALEN, temelde kültüre edilmiş memeli hücrelerinde gen düzenlenmesi amacıyla kullanılmasının yanı sıra virüs, bakteri, nematod, kurbağa, bitki, böcek, fare, sıçan, domuz gibi organizmalarda endojen gen sisteminin modifiye edilmesi amacıyla da kullanılmaktadır (Gaj ve ark., 2013; Segal ve Meckler, 2013). TALEN'ler yapı bakımından ZFN'ye benzemektedir, fakat TALEN'lerin herhangi bir DNA dizisine göre dizayn edilebilme özelliği diğer nükleazlarla karşılaştırıldığında avantaj olarak görülmektedir. TALEN'lerin dizayn edilmesindeki zorluk, hedef dizinin 5' ucunda iki amino-terminal şifreli tekrar içeren katlanmalar tarafından tanıyan timin nükleotidinde ihtiyaç duymasıdır (Miller ve ark., 2011; Mak ve ark., 2012; Ozyigit ve ark., 2021).

Prokaryot canlılarda CRISPR olarak adlandırılan belirli DNA bölgeleri kazanılmış bağışıklık sisteminin oluşturulmasında ilk sırada yer alan en önemli unsurdur (Jansen

ve ark., 2002; Barrangou ve ark., 2007). Ishino ve ark. (1987) tarafından *Escherichia coli* üzerinde yapılan bir çalışma sırasında apoptoz inhibitör protein (IAP) gen dizi analizleri yapılırken CRISPR bölgelerinin tekrarlayan palindromik dizilerinin varlığı belirlenmiştir. Apoptoz inhibitör protein gen dizi analizleri sırasında belirli tekrarlar ile karakterize yaklaşık 29 nükleotid ve bu tekrar kümelerinin arasında bulunan yaklaşık 32 nükleotidlik bölgeler (ara DNA bölgeleri) belirlenmiş, fakat tam olarak özellikleri anlaşılamamıştır. Son dönemde yapılan çalışmalar ile tekrar eden DNA bölgelerinin dizi analizleri sonucu transpozonların, bakteriyofajların ve plazmidlerin ekzojen genetik materyaller ile özdeş yapıya sahip olduğu, bununla birlikte bu tekrarlayan DNA bölgelerinin çok sayıda bakteride bulunduğu bildirilmiştir (Bolotin ve ark., 2005).

Biyoinformatik analizler neticesinde CRISPR bölgeleri çevresinde *Cas* (CRISPR Associated) adı verilen genlerin bulunduğu ve CRISPR bölgeleri ile ilişkili olduğu ifade edilmekle birlikte çoğu *Cas* geninin helikaz ve nükleaz gen ailelerine ait benzer özellik gösteren dizi grupları içerdiği belirtilmiştir (Jansen ve ark., 2002). Bu bilgiler ışığında CRISPR/*Cas* sistemine ait bilgilerin RNA aracılı bir savunma sisteminden kaynaklanabileceği düşüncesi ortaya konmuştur. Barrangou ve ark. (2007)'nin yaptıkları çalışma ile bu hipotez doğrulanmış olup, bakteriyofaj durumuna karşı CRISPR dizilerinin ve protein yapılarının müdahalede bulunduğu ispatlanmıştır. Son yıllarda CRISPR/*Cas* mekanizmasının, RNA aracılı müdahale yöntemiyle ilişkili yapmış olduğu değişiklikler ve bu değişikliklere ait veriler büyük oranda açığa kavuşturulmuştur (Barrangou ve ark., 2007).

CRISPR dizilerine ait bölgelerin en spesifik özelliği, içerdikleri tekrarlayan kısa DNA dizileridir. Aralayıcı (spacer) olarak adlandırılan DNA bölgeleri ise palindromik DNA dizi tekrarlarının arasında yer almakla birlikte, bu aralayıcı bölgeler özgün DNA dizilerinden oluşturulan ve kazanılmış bağışıklık sisteminin temel yapısını oluşturan etmenlerdir (Ozyigit ve ark., 2021).

Prokaryotik bir yapının daha önce karşılaşmış olduğu virüs ile tekrar karşılaşmasından sonra bu aralayıcı diziler patojene karşı tanıma bölgesi olarak tepki vermekte, istilacı yapıyı ortadan kaldırmak için harekete geçmektedir. Bu durum aralayıcı bölgelerin virüs ya da plazmidlerin nükleik asit yapılarının prokaryot genomuna aktarılması esasına dayanmaktadır (Barrangou ve Oost., 2013). CRISPR bölgesinde yer alan tekrar dizileri ve boyutları çoğunlukla korunmakta, fakat farklı genom yapılarında bu durum değişebilmektedir. CRISPR lokusu içinde tekrar dizilerinin boyutları 21-48 baz çifti arasındayken, aralayıcı bölgelerinin boyutları 26-72 baz çifti aralığında bulunmaktadır (Bolotin ve ark., 2005; Garneau ve ark., 2010; Horvath ve Barrangou, 2010).

Tek bir genom üzerinde bulunan CRISPR bölgesi bir ya da daha fazla sayıda olabilmektedir. CRISPR bölgesinde bulunan ve "lider dizi" olarak adlandırılan korunmuş bölgeler, transkripsiyon yönünün belirlenmesine imkân sağlamaktadır (Jansen ve ark., 2002). *Cas* gen bölgeleri, CRISPR sistemine ait diğer önemli bileşendir. *Cas* genleri genel olarak CRISPR sisteminin yakınında bulunmakla birlikte, prokaryotların savunma sistemleri için oldukça önem arz etmektedir. Çünkü bu gen dizilerinin içinde helikaz ve nükleaz yapılarının bulunması DNA dizilerinin açılmasına ve kesilmesine imkân sağlamaktadır. Bunun için proteinlerinin nükleaz, helikaz ya da RNA bağlanma proteini şeklinde fonksiyon gösterebilmesi için nükleik asitlerle etkileşim halinde olması gerekmektedir (Makarova ve ark., 2002; Horvath ve Barrangou, 2010).

3. Gıda alanında CRISPR kullanımı / Use of CRISPR in food

Gıda bilimi hızla büyüyen dünya nüfusu için güvenli ve sürdürülebilir gıda üretimini iyileştirmek amacıyla tüm biyolojik, kimyasal ve fiziksel süreçleri araştıran, birçok bilim ve disiplinin araştırma faaliyetlerinin ortak alanı olarak tanımlanmaktadır. Gıda teknolojisinde formülasyon, işleme, depolama ve ürün geliştirilmeye yönelik zaman içinde birçok farklı yöntemler uygulanmıştır (Selle ve Barrangou, 2015). Gıdalarda var olan mikroorganizmaların bazıları ürün prosesinde fayda sağlarken bazılarının ise zararlı etkileri nedeniyle kontrol altına tutulmaları gerekmektedir. Zararlı mikroorganizmalar gıda ürünlerindeki varlıkları ile gıda kaynaklı hastalıklara ve gıdalarda bozulma gibi pek çok olumsuzluğa yol açarken, faydalı mikroorganizmalar gıdaları uzun süre koruma ve bireylerin sindirim sisteminde düzen sağlama gibi pek çok alanda kullanılmaktadır. Gıdaların yapısında bulunan basit karbonhidratlar, lipitler, proteinler, mineral ve vitaminler gibi değerli substratların varlığı yararlı ve zararlı mikroorganizmaların üreme ve çoğalması için uygun ortamı sağlamaktadır (Papadimitriou ve ark., 2015; Stout ve ark., 2017).

Fermente gıdalar, gıda biliminin temelini oluşturmakta ve süt, et, sebzeler ve tahıllar en yaygın substratlardan sayılmaktadır. Başlangıç kültürleri bu substratları ilgili ürünlere dönüştürmede önemli bir rol almaktadır (Caplice ve Fitzgerald, 1999). Son zamanlarda üzerinde yoğunlaşılacak mikroorganizmalar ise probiyotiklerdir. Probiyotikler "yeterli miktarda uygulandıklarında konağa yarar sağlayan canlı mikroorganizmalar" olarak tanımlanmaktadır (Hill ve ark., 2014; Stout ve ark., 2017).

Başlangıç kültürleri ve probiyotikler binlerce yıldır kullanılmaktadır, fakat bazı durumlarda bakteriyofaj probleminden dolayı fermentasyon işlemi aksayabilmektedir. Yapılan araştırmalarda laktik asit üreten mikroorganizmalarda analiz edilen laktobasil genomlarının %62,9'unda ve bifidobakteri genomlarının %77'sinde CRISPR/*Cas9* lokuslarının olduğu tespit edilmiştir (Briner ve ark., 2015; Sun ve ark., 2015; Stout ve ark., 2017). CRISPR/*Cas9* sistemlerinin bu mikroorganizmalarda bulunuyor olması faj kaynaklı fermentasyon işlemlerindeki başarısızlıklara engel olmak için bir bakış açısı sağlamaktadır. Ek olarak suş tipleme, plazmid aşılama, genom düzenleme ve antimikrobiyal aktivite uygulamalarıyla fermentasyon süreçlerinde güçlü bir araç olabilmektedir. Bu uygulamaların birçoğu her yıl gıda kayıplarının oluşmasına neden olan zararlı mikroorganizmaların kontrolünde ve yararlı mikroorganizmaların yönetilmesinde CRISPR/*Cas9* sisteminin kullanımı ile yapılabileceği değerlendirilmektedir (Scallan ve ark., 2011; Scharff, 2012; Stout ve ark., 2017).

FDA (U.S. Food and Drug Administration-Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi), insan tüketimi için Maynard Aqua Bounty Teknoloji tarafından üretilmiş hızlı büyüyen somon balıklarını onaylamış ve bu hayvanlar ilk CRISPR/*Cas9* sistemi ile üretilmiş transgenik hayvanlar olarak kayıtlanmıştır. Fakat bu üretim etik olarak tartışılmakta ve bazı bilim insanları bu transgenik hayvanların kaçması durumunda ekolojik dengeyi bozabileceklerini düşünmektedir. Bu tür endişeleri gidermek için ise Alabama'da bulunan Auburn Üniversitesi'nde bir grup araştırmacı transgenik balıklar üzerinde üreme hormonlarını kontrol eden genleri CRISPR/*Cas9* ile etkisiz hale getirmek için çalışmalar yapmış, sonuç olarak kısırlaştırılmış balıkların popülasyon üzerinde istenmeyen herhangi bir genetik etki

yaratamayacağını ileri sürmüşlerdir (Tan ve ark., 2013; FDA, 2015; Ledford, 2015; Reardon, 2016).

Et endüstrisinde genellikle besi hayvanı olarak erkek hayvan tercih edilmektedir. Konu ile ilgili araştırmacılar üretimde ya sadece erkek hayvanların ya da daha kaslı dişi sığırların doğması konusunda çalışmalar yapmaktadır. Ayrıca uzun boynuzlarından dolayı yaralanmalara sebep olan sığır ırklarında olası sağlık problemlerine engel olmak için boynuz kesimleri yapıldığı bilinmektedir (Tan ve ark., 2013). Boynuz kesim işlemine önüne geçmek için CRISPR/Cas9 kullanarak boynuzsuz hayvan üretme çalışmaları yapılmış ve doğan iki adet buzağı bu konuda araştırmalara konu olmuştur (Tan ve ark., 2013; Ledford, 2015; Reardon, 2016). Kanatlı endüstrisinde ise yumurtacı olarak kullanılan tavukların erkek civciv yumurtalamasına karşın, erkek embriyolarının ultraviyole ışık altında parlaması için tavukların cinsiyet kromozomlarına yeşil floresan proteini için bir gen eklemektedirler. Bu sayede, erkek civcivler yumurtadan çıkmadan saptanabilmekte ve başta aşı üretimi gibi farklı alanlarda kullanabilmektedirler (Tan ve ark., 2013; Reardon, 2016).

Hayvan ıslahında yapılan çalışmalarda karşılaşılan bazı sorunlar bulunmaktadır. Bunlardan biri ekonomik özellikleri kontrol eden gen bölgeleri arasındaki negatif korelasyonlardır. Örneğin et verimi iyi olan bir sığırın süt verimindeki zayıflık ya da yumurta verimi iyi olan bir tavuğunun yaşama süresinin kısa olması gibi durumlar yıllardır bilinmektedir. CRISPR/Cas9 sistemi sayesinde bu gibi olumsuz durumların ıslahının mümkün olacağı düşünülmektedir. Bunların yanı sıra çiftlik hayvanlarında yapılacak olan genom düzenleme çalışmaları ile hastalıklara karşı direnç geliştirmede, ürün verimini ve ürünlerin kalitesini arttırmada, yeni biyomedikal modelleri oluşturmada, adaptasyon kabiliyetini arttırmada, döl verimini yükseltmede, yemden yararlanımı arttırmada, kalıtsal hastalıkları tedavide ve yeni nesle aktarımına engel olmada bir yöntem olarak kullanılmaktadır (Proudfoot ve ark., 2015). Gerçekleştirilen genom modifikasyonları ile hayvansal gıda üretimi ve tarım alanındaki hayvanların verimlerini arttırma çalışmalarının yanı sıra organ nakilleri konusunda da çalışmalar yapılmaktadır. Bu kapsamda domuz embriyolarına verilen insan kök hücrelerinin nakil bekleyen insanlara aktarımına yönelik çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir (Hackett ve ark., 2014). Bitkilerin tat ve besin değerlerini arttırmak ya da yapılan işlemler sonrasında aroma kaybını önlemek, bitkilerin hastalıklara dirençlerini arttırmak ve hastalıklarını azaltmak, verimi arttırmak, zehirli ağaçları gıdaya döndürmek ve gluten gibi alerjenlerde değişimler sağlamak CRISPR/Cas9'un tarım alanındaki kullanım amaçlarıdır (Zhang ve ark., 2020). CRISPR sisteminin keşfinden sonra ilk çalışma Feng ve ark. (2013) tarafından pirinç genomu üzerine yapılmıştır. Bu ilk çalışmanın ardından sistemin uygulanabilirliği ispatlanmış olup ardından buğday (Wang ve ark., 2014), mısır (Liang ve ark., 2014), pirinç (Miao ve ark., 2013) gibi yüksek besin değerine sahip mahsullerde de çalışmalar yapılmıştır.

CRISPR/Cas9 sisteminin avantajları ve olumlu yönlerde yapılan öngörülerini yanında dezavantajları ve etik problemleri de mevcuttur. ZFN ve TALEN gibi spesifik bölgeleri hedef alan genom düzenleme yöntemlerine nazaran düşük maliyetli, tasarımı kolay ve birçok geni değiştirmeye olanak sağlayan bu yöntemin bitkiler ve hayvanlarda kullanımını kısıtlayan bazı faktörler mevcuttur (O'Geen ve ark., 2015). Bunlardan birisi değişiklik yapılması istenen bölgeye bağlanması istenen yaklaşık 20 bazlık gRNA'ların, genomun herhangi bir yerine bağlanabilme olasılığı bulunmasıdır (Ozyigit ve ark., 2021). Bu

da aktarımı gerçekleşen CRISPR/Cas9 sisteminin genomun farklı bölgelerinde hedef dışı etkilerin olma olasılığını arttırarak, çeşitli hastalıkları ortaya çıkarabileceği ve hedef bölgede komşu genlerinde etkilenmesi gibi birçok problemin oluşmasına sebep olabileceği akla gelmektedir. CRISPR'la ilgili yapılan çalışmaların çoğu, hedef bölgenin spesifitesini arttırmak için yeni yöntemler geliştirmektedir. Bu sayede hedef dışı etkiyi azaltarak istenilen değişiklikleri gerçekleştirmek amaçlanmaktadır (O'Geen ve ark., 2015). CRISPR/Cas9 sisteminin teması DNA'da istenen yönde değişiklik yapmak olduğundan, istenmeyen olası bir durumda organizma yarardan ziyade zarar görecektir. Ayrıca çiftlik hayvanlarında yapılmış çalışmaların hiçbirinde yetişkin bir hayvan kullanılmamış ve kullanılabileceği herhangi bir transfeksiyon metodu üstünde çalışılmamıştır (Cildir ve Ozmen 2018). Sistemin günümüzde kullanılma şekli yalnızca istenilen değişiklikleri barındıran yavrular elde etmeye olanak sağlamasıdır. Bir başka dezavantaj ise embriyolara yönelik yapılan çalışmalarda aktarımı gerçekleşen sistemin hücrelerin her birinde aynı zamanda çalışmamasıdır (Crispo ve ark., 2015; Peterson ve Niemann, 2015; Bevacqua ve ark., 2016; Wang ve ark., 2016; Zuo ve ark., 2016; Niu ve ark., 2017).

Etik tartışmaların en önemlisi geliştirilen bu yöntemin canlıların eşey hücrelerini manipüle etmede kullanılabilme olasılığıdır. İnsan dahil tüm canlı organizmaların embriyolarında herhangi bir özelliğin istenen yönde değiştirilebilmesi hatta istenen özelliklere sahip bebeklerin tasarlanabilmesi mümkün olmaktadır (Kose ve ark., 2020). Değiştirilmesi düşünülen genin bütün özellikleri bilinmiyor ise bu geni inaktive etmenin bir sonraki nesilde nasıl etkiler doğuracağı öngörülemezdir (Bilgi ve ark., 2016).

4. GDO ile arasındaki farklar ve yasal mevzuat / Differences with GMO and legal legislation

CRISPR/Cas9 ile genetik olarak düzenlenmiş bir organizmanın, genetiği değiştirilmiş bir organizma (GDO) olup olmadığı konusunda devam eden bir tartışma bulunmaktadır. Son zamanlarda, ABAD (Court of Justice of the European Union-Avrupa Birliği Adalet Divanı), bu tür ürünlerin en azından Avrupa Birliği'nde GDO olarak kabul edildiği kararını almıştır (Sands ve Galizzi, 2006; ABAD, 2018; Es ve ark., 2019). GDO, kromozom boyunca rastgele konumlara entegre edilen, bilinen fonksiyon genlerinin aktarıldığı bir organizma iken, genetiği düzenlenmiş bir organizma, genomun kesin konumlarına hedeflenen gen işlevlerinin belirli değişiklikleriyle, ekspresyonunu inaktive etmek veya iyileştirmek için eklenen rastgele değişikliklerden kaçınan bir organizmadır (Georges ve Ray, 2017). Bu özelliklere sahip yeni bir teknoloji ortaya çıktığında, insanlar arasında güvenli kullanımı, düzenlenmesi ve etik kuralları ile ilgili soruların ortaya çıkması olasıdır (Araki ve Ishii, 2015). Fakat CRISPR/Cas9 sistemi genetiği değiştirilmiş organizmalardan farklı bir durum içerir. Bu sistemin temeli organizmada bulunan potansiyelin ortaya çıkarılması üzerinedir ve bu durum sistemin daha kolay benimsenmesine neden olacağı düşünülmektedir. CRISPR/Cas9 sistemiyle ilgili yapılan çalışmalar genel olarak insanların genetik yapısında bulunan kalıtsal hastalıklar üzerine yoğunlaşmıştır. Bunun nedeni olarak kalıtsal hastalığa sahip kişinin ve gelecek nesillerinin bu hastalıktan kurtarılabilir olmasıdır. Bununla birlikte kompleks organizmalarda gen ifadesinin düzenlenmesi ile ilgili aşamaların karmaşıklığı, bu yöntemle düzeltilmeye çalışan olumsuzlukların şimdilik sadece basit kalıtsal modellere sahip

gen bölgeleriyle kısıtlı kalmasına neden olmaktadır (Bilgi ve ark., 2016; ABAD, 2018).

Amerika Birleşik Devletleri'nde FDA (Food and Drug Administration-Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi), EPA (United States Environmental Protection Agency - Çevre Koruma Kurumu) gibi resmi otoriteler GDO düzenlemesi, mikroorganizma ve pestisitlerin denetim ve düzenlenmesi gerçekleştirilir (EPA, 2013; Es ve ark., 2019). Türkiye'de ise tarımsal biyoteknoloji yönünden çalışma yapan 8 araştırma merkezi bulunmaktadır ve bu konuda çalışmalar yapan ar-ge kuruluşları ve konu ile ilgili bölümleri olan üniversitelerde çalışan personeller yeterli alt yapıya sahiptir. Ancak var olan yasal düzenlemeler bu konuda yetersiz kalmaktadır ve yeni kaynaklara, yatırımlara ve bazı teşviklere ihtiyaç duyulmaktadır. Türkiye'de GDO'yu ilgilendiren yönetmelik 26.03.2010 tarihinde "Biyogüvenlik Kanunu" adı altında yürürlüğe girmiştir. Ülkemizde genetiği değiştirilmiş ürünler ile ilgili ithalatçı firmaların yaptığı başvurular Tarım ve Orman Bakanlığı çalışanları ve risk değerlendirme komiteleri tarafından biyogüvenlik kanununda bulunan kurallar kapsamında incelenip rapor edilmektedir. 2017'den günümüze kadar kanuna uygun görülen ve hayvansal yem olarak kullanımına izin verilen 36 çeşit soya ve mısır vardır (Elpe, 2021).

Avrupa Yüksek Mahkemesi 25 Temmuz 2018 tarihinde "Gen düzenlenmiş gıdalar, geleneksel genetiği değiştirilmiş organizmaları yöneten aynı katı düzenlemelere tabi olmalıdır" kararı vermiştir (ABAD, 2018).

Bazı araştırmacılar CRISPR/Cas9 gibi yeni olan ve hassas gen düzenleme teknolojileri kullanılarak oluşturulan organizmaların, GDO'lu ürünlerin ekimini ve satışını sınırlayan mevcut Avrupa Birliği mevzuatından muaf tutulması gerektiğini savunmuşlardır (Callaway, 2018; Verma ve ark., 2021; Mali, 2022).

5. Sonuç ve öneriler / Conclusion and recommendations

Kaynaklar / References

- Araki, M., & Ishii, T. (2015). Towards social acceptance of plant breeding by genome editing. *Trends in plant science*, 20(3), 145-149.
- ABAD, (2018). Court of Justice of the European Union, Organisms obtained by mutagenesis are GMOs and are, in principle, subject to the obligations laid down by the GMO Directive. No: 111/18, C-528/16.
- Anonim, (2020). The Nobel Prize News, <https://www.nobelprize.org/all-nobel-prizes-2020/> Last accessed on March 2022.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., & Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315(5819), 1709-1712.
- Barrangou, R., & van der Oost, J. (2013). RNA-mediated Adaptive Immunity in Bacteria and Archaea. In CRISPR-Cas Systems. Springer Verlag.
- Berkeley News, (2018). Doudna-Charpentier team awarded U.S. patent for CRISPR-Cas9. Berkeley News. <https://news.berkeley.edu/2018/06/19/doudna-charpentier-team-awarded-u-s-patent-for-crispr-cas9/> Erişim tarihi: 12.03.2022.
- Bevacqua, R. J., Fernandez-Martín, R., Savy, V., Canel, N. G., Gismond, M. I., Kues, W. A., & Salamone, D. F. (2016). Efficient edition of the bovine PRNP prion gene in somatic cells and IVF embryos using the CRISPR/Cas9 system. *Theriogenology*, 86(8), 1886-1896.
- Bigliardi, B., & Galati, F. (2013). Innovation trends in the food industry: the case of functional foods. *Trends in Food Science & Technology*, 31(2), 118-129.
- Bilgi, F., Demirtaş, Z., & Mercan, L. (2016). Hayvan İslahında Güncel Bir Yaklaşım: CRISPR/Cas9 Genom Modifikasyon Sistemi. *Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 4(12), 1118-1122.
- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., & Ehrlich, S. D. (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 151(8), 2551-2561.
- Briner, A. E., Lugli, G. A., Milani, C., Duranti, S., Turroni, F., Gueimonde, M., & Barrangou, R. (2015). Occurrence and diversity of CRISPR-Cas systems in the genus *Bifidobacterium*. *PLoS one*, 10(7), e0133661.
- Callaway, E. (2018) EU law deals blow to CRISPR crops. *Nature*. 560(7716), 16.
- Caplice, E., & Fitzgerald, G. F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International journal of food microbiology*, 50(1-2), 131-149.
- Cho, S. W., Kim, S., Kim, Y., Kweon, J., Kim, H. S., Bae, S., & Kim, J. S. (2014). Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome research*, 24(1), 132-141.
- Cildir, O. S., & Ozmen, O. (2018). Çiftlik Hayvanlarında CRISPR/Cas9 Uygulamaları. *Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences*, 32(3), 559-566.
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121), 819-823.
- Crispo, M., Mulet, A. P., Tesson, L., Barrera, N., Cuadro, F., dos Santos-Neto, P. C., & Menchaca, A. (2015). Efficient generation of myostatin knock-out sheep using CRISPR/Cas9 technology and microinjection into zygotes. *PLoS one*, 10(8), e0136690.
- Deng, L., Kenchappa, C. S., Peng, X., She, Q., & Garrett, R. A. (2012). Modulation of CRISPR locus transcription by the repeat-binding protein Cbp1 in *Sulfolobus*. *Nucleic acids research*, 40(6), 2470-2480.
- Ding, Q., Strong, A., Patel, K. M., Ng, S. L., Gosis, B. S., Regan, S. N., &

- Musunuru, K. (2014). Permanent alteration of PCSK9 with in vivo CRISPR-Cas9 genome editing. *Circulation research*, 115(5), 488-492.
- Elpe, S. (2021). Are Genetically Modified Organisms Safe for Human Health and the Environment? *Journal of Medical Sciences*, 2(4), 10-19.
- EPA. (2013). United States Environmental Protection Agency, Regulation of Genetically Engineered Microorganisms Under FIFRA, FFDCA and TSCA. Regulation of Biotechnology under TSCA and FIFRA, 57-94.
- Es, I., Gavahian, M., Marti-Quijal, F. J., Lorenzo, J. M., Khaneghah, A. M., Tsatsanis, C., & Barba, F. J. (2019). The application of the CRISPR-Cas9 genome editing machinery in food and agricultural science: Current status, future perspectives, and associated challenges. *Biotechnology advances*, 37(3), 410-421.
- Esen, V.K., Cemal, I., & Elmali, C. (2020). Genom Düzenleme Teknikleri ve Hayvan İslahında Kullanılabilirliği. *Hayvan Bilim ve Ürünleri Dergisi*, 3(2): 189-209.
- FDA. (2015). Food and Drug Administration, AquaBounty Technologies' application to produce AquaAdvantage Salmon, a genetically engineered (GE) Atlantic salmon. AquaBounty Technologies, Inc. NADA 141-454.
- Feng, Z., Zhang, B., Ding, W., Liu, X., Yang, D. L., Wei, P., ... & Zhu, J. K. (2013). Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell research*, 23(10), 1229-1232.
- Gaj, T., Gersbach, C. A., & Barbas III, C. F. (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in biotechnology*, 31(7), 397-405.
- Garneau, J. E., Dupuis, M. È., Villion, M., Romero, D. A., Barrangou, R., Boyaval, P., ... & Moineau, S. (2010). The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 468(7320), 67-71.
- Georges, F., & Ray, H. (2017). Genome editing of crops: a renewed opportunity for food security. *GM Crops and Food*, 8(1), 1-12.
- Hackett, P.B., Fahrenkrug, S.C., & Carlson, D.F. (2014) The Promises and Challenges of Precision Gene Editing in Animals of Agricultural Importance. *NABC Report*. 26: 39-45.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews Gastroenterology and hepatology*.
- Horvath, P., & Barrangou, R. (2010). CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, 327(5962), 167-170.
- Hwang, W. Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M. L., Tsai, S. Q., Sander, J. D., & Joung, J. K. (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature biotechnology*, 31(3), 227-229.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of bacteriology*, 169(12), 5429-5433.
- Jansen, R., Embden, J. D. V., Gastra, W., & Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular microbiology*, 43(6), 1565-1575.
- Jinek, M., East, A., Cheng, A., Lin, S., Ma, E., & Doudna, J. (2013) RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife*. 2: e00471.
- Kose, S.B.E., Sura, Ü., Yirun, A., Balcı, A., Gümüşel, B.K., & Erkekoglu, P. (2020) CRISPR-Cas9 Teknolojisi, Güvenliliği ve Etik Açından Değerlendirilmesi. *Literatür Eczacılık Bilimleri Dergisi*, 9(1): 50-64.
- Ledford, H. (2015). Salmon approval heralds rethink of transgenic animals. *Nature News*, 527(7579), 417.
- Liang, Z., Zhang, K., Chen, K., & Gao, C. (2014). Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. *Journal of Genetics and Genomics*, 41(2), 63-68.
- Luthra, R., Kaur, S., & Bhandari, K. (2021). Applications of CRISPR as a potential therapeutic. *Life Sciences*, 284, 119908.
- Mak, A.N., Bradley, P., Cernadas, R.A., Bogdanove, A.J., & Stoddard, B.L. (2012) The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target. *Science*. 335: 716-719.
- Makarova, K. S., Aravind, L., Grishin, N. V., Rogozin, I. B., & Koonin, E. V. (2002). A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucleic acids research*, 30(2), 482-496.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E., & Church, G.M. (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 339: 823-826.
- Mali, F. (2022). Key Socio-Economic and (Bio) Ethical Challenges in the CRISPR-Cas9 Patent Landscape. *Genome Editing in Drug Discovery*, 315-327.
- Miao, J., Guo, D., Zhang, J., Huang, Q., Qin, G., Zhang, X., ... & Qu, L. J. (2013). Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. *Cell research*, 23(10), 1233-1236.
- Miller, J. C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K. A., Wang, J., Xia, D. F., & Rebar, E. J. (2011). A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature biotechnology*, 29(2), 143-148.
- Niu, Y., Jin, M., Li, Y., Li, P., Zhou, J., Wang, X., & Chen, Y. (2017). Biallelic β -carotene oxygenase 2 knockout results in yellow fat in sheep via CRISPR/Cas9. *Animal genetics*, 48(2), 242-244.
- O'Geen, H., Abigail, S. Y., & Segal, D. J. (2015). How specific is CRISPR/Cas9 really?. *Current opinion in chemical biology*, 29, 72-78.
- Ouyang, B., Gu, X., & Holford, P. (2017). Plant genetic engineering and biotechnology: a sustainable solution for future food security and industry. *Plant Growth Regulation*, 83(2), 171-173.
- Ozyigit, I. I., Can, H., & Dogan, I. (2021). Phytoremediation using genetically engineered plants to remove metals: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(1), 669-698.
- Papadimitriou, K., Pot, B., & Tsakalidou, E. (2015). How microbes adapt to a diversity of food niches. *Current Opinion in Food Science*, 2, 29-35.
- Petersen, B., & Niemann, H. (2015). Molecular scissors and their application in genetically modified farm animals. *Transgenic research*, 24(3), 381-396.
- Proudfoot, C., Carlson, D. F., Huddart, R., Long, C. R., Pryor, J. H., King, T. J., & Fahrenkrug, S. C. (2015). Genome edited sheep and cattle. *Transgenic research*, 24(1), 147-153.
- Reardon, S. (2016) Welcome to the CRISPR zoo. *Nature*. 531(7593), 160.
- Ruan, J., Xu, J., Chen-Tsai, R. Y., & Li, K. (2017). Genome editing in livestock: Are we ready for a revolution in animal breeding industry?. *Transgenic research*, 26(6), 715-726.
- Sands, P., & Galizzi, P. (2006). Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC (OJ L 106 17.04.2001 1) In: Documents in European Community Environmental Law. (pp 787-836). Cambridge University Press, Cambridge.
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., & Griffin, P. M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerging infectious diseases*, 17(1), 7.
- Scharff, R. L. (2012). Economic burden from health losses due to foodborne illness in the United States. *Journal of food protection*, 75(1), 123-131.
- Segal, D. J., & Meckler, J. F. (2013). Genome engineering at the dawn of the golden age. *Annual review of genomics and human genetics*, 14, 135-158.
- Selle, K., & Barrangou, R. (2015). CRISPR-Based technologies and the future of food science. *Journal of food science*, 80(11), R2367-R2372.
- Seok, H., Deng, R., Cowan, D. B., & Wang, D. Z. (2021). Application of CRISPR-Cas9 gene editing for congenital heart disease. *Clinical and experimental pediatrics*, 64(6), 269.
- Stout, E., Klaenhammer, T., & Barrangou, R. (2017). CRISPR-Cas technologies and applications in food bacteria. *Annual review of food science and technology*, 8, 413-437.
- Sun, Z., Harris, H. M., McCann, A., Guo, C., Argimón, S., Zhang, W., & O'Toole, P. W. (2015). Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. *Nature communications*, 6(1), 1-13.
- Tan, W., Carlson, D. F., Lancto, C. A., Garbe, J. R., Webster, D. A., Hackett, P. B., & Fahrenkrug, S. C. (2013). Efficient nonmeiotic allele introgression in livestock using custom endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(41), 16526-16531.
- Verma, A. K., Mandal, S., Tiwari, A., Monachesi, C., Catassi, G. N., Srivastava, A., ... & Catassi, C. (2021). Current status and perspectives on the application of CRISPR/Cas9 Gene-editing system to develop a low-gluten, non-transgenic wheat variety. *Foods*, 10(10), 2351.
- Veron, N., Qu, Z., Kipen, P. A., Hirst, C. E., & Marcelle, C. (2015). CRISPR mediated somatic cell genome engineering in the chicken. *Developmental biology*, 407(1), 68-74.
- Wang, X., Cai, B., Zhou, J., Zhu, H., Niu, Y., Ma, B., Yu, H., Lei, A., Yan, H., Shen, X., Shi, L., Zhao, X., Hua, J., Huang, X., Qu, L., & Chen, Y. (2016). Disruption of FGF5 in Cashmere Goats Using CRISPR/Cas9 Results in More Secondary Hair Follicles and Longer Fibers. *PLoS One*

- 11 (10).
- Wang, Y., Cheng, X., Shan, Q., Zhang, Y., Liu, J., Gao, C., & Qiu, J. L. (2014). Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature biotechnology*, 32(9), 947-951.
- Xue, W., Chen, S., Yin, H., Tammela, T., Papagiannakopoulos, T., Joshi, N.S., Cai, W., Yang, G., Bronson, R., Crowley, D.G., Zhang, F., Anderson, D.G., Sharp, P.A., & Jacks, T. (2014) CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. *Nature*. 514(7522): 380-384.
- Young, S. A., Miyata, H., Satouh, Y., Kato, H., Nozawa, K., Isotani, A., & Ikawa, M. (2015). CRISPR/Cas9-mediated rapid generation of multiple mouse lines identified *Ccdc63* as essential for spermiogenesis. *International journal of molecular sciences*, 16(10), 24732-24750.
- Zhan, T., Rindtorff, N., Betge, J., Ebert, M. P., & Boutros, M. (2019, April). CRISPR/Cas9 for cancer research and therapy. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 55, pp. 106-119). Academic Press.
- Zhang, Y., Pribil, M., Palmgren, M., & Gao, C. (2020) A CRISPR way for accelerating improvement of food crops. *Nature Food* 1(4): 200-205.
- ZMO, (2020b) Türkiye Ziraat Mühendisliği IX. Teknik Kongresi Bildiriler Kitabı-1. https://www.zmo.org.tr/resimler/ekler/3e99ecaf98a5e17_ek.pdf Erişim tarihi: 12.03.2022.
- Zuo, Q., Wang, Y., Cheng, S., Lian, C., Tang, B., Wang, F., & Li, B. (2016). Site-directed genome knockout in chicken cell line and embryos can use CRISPR/Cas gene editing technology. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 6(6), 1787-1792.

Cite as/Atf şekli: Bolukbas, A., & Gucukoglu, A. (2022). CRISPR/Cas9 teknolojisi ve gıda alanında kullanımı. *Front Life Sci RT*, 3(1), 36-42.