



PROJECTE NATURA: QUÈ ÉS EL CRISPR?

RESUM:

El projecte "Què és el CRISPR?" tracta de transmetre les idees bàsiques sobre aquesta famosa tècnica d'edició genètica, el CRISPR-Cas9. Aquesta tècnica ha suposat una gran revolució, ja que, permet editar els gens de cèl·lules vives de forma dirigida, és a dir, es pot manipular aquella o aquelles parts del genoma que es desitja de forma directa i eficient.

L'objectiu d'aquest projecte és l'aprenentatge sobre com funciona el CRISPR-Cas9, les seues aplicacions i els distints problemes ètics que aquesta tècnica comporta. Per aconseguir aquest objectiu s'ha elaborat una "Escape room" mitjançant la qual els seus participants aprenen què és aquesta tècnica i com funciona.

Curs 2019-2020

ÍNDIX

1. Equip docent	3
2. Objectius	4
2.1. Tema en què s'emmarca el projecte	4
2.2. Concepte a transmetre	5
2.3. Objectius	5
2.4. Competències bàsiques	6
3. Materials i metodologia	6
4. Descripció detallada	8
5. Conclusions	20
6. Valoració del projecte	24
7. Imatges del desenvolupament del projecte	25
8. Exposició de les dificultats per desenvolupar el projecte	30
9. Bibliografia	31

1. EQUIP PARTICIPANT

Títol del projecte: Què és CRISPR?			
	Nom i Cognoms	Centre	Correu electrònic
Alumne/a UVEG	Clara Bou Vidagañ	Universitat de València	clabouvi@alumni.uv.es
Professor/a de la UVEG	Inmaculada Quilis Bayarri	Universitat de València	Inmaculada.quilis@uv.es
Professor/a de secundària	Pascual Hernández	Col·legi Ave Maria	pascualhernandez@colegioavemaria.com
Mestre/a de Primària	Maria Chorro Giner	Col·legi Ave Maria	mariachorro@colegioavemaria.com

ALUMNES DE SECUNDÀRIA PARTICIPANTS	Curs	Assignatura
Aparicio Llorens, Sergi	4rt ESO	Biologia i Geologia
Bataller Ribero, Antoni		
Bataller Ribero, Ignaci		
Clausi Alimiñana, Clara		
Gomez Ahullana, Pablo		
Izza Lozano, Sheila		
Lafuente Vaya, Andreu		
Llopis Montes, Hector		
Martinez Sola, Miguel		
Montiel Castillo, Marc		
Puig Perez, Andrés		
Rubio Vila, Alba		
Sanz Sola, Lucia		
Talens Santos, Ferran		

Nombre d'alumnes de primària que poden participar: Entre 20 – 25 alumnes.

Curs recomanat: 5é de primària o cursos superiors, ja que, les activitats han sigut adaptades per a aquest nivell.

Projecte interdepartamental: No.

2. OBJECTIUS

2.1 TEMA EN QUÈ S'ENMARCA EL PROJECTE: *Contextualització del projecte dins d'un marc temàtic concret de les Ciències Natural.*

El tema sobre el que s'emmarca el projecte és el CRISPR-Cas9, una tècnica biotecnològica d'edició genètica que ha anat donant-se a conèixer durant els últims anys degut a les seues amplies aplicacions i avantatges que pot proporcionar. Aquest projecte té com a finalitat augmentar el coneixement dels alumnes d'ensenyaments pre-universitaris sobre què és la biotecnologia, centrant-se en què és el CRISPR-Cas9, com funciona, les seues possibles aplicacions i les diferents discussions ètiques que sorgeixen degut al seu ús. Aquest objectiu s'aconseguirà fent que els alumnes de secundària es converteixen en els professors, i que aquests preparen junt a l'alumne universitari una "escape room" amb les proves que permeten transmetre tots els seus coneixements apresos als alumnes de primària, els quals realitzaran aquesta activitat.

Bloc temàtic de primària i de secundària:

En quan a primària, segons el Decret 108/2014 del 4 de juliol del Consell [25], la temàtica del nostre projecte pertany al bloc III del curs, anomenat "Els sers vius" on aprofundeixen en l'estructura interna dels éssers vius: cèl·lules, teixits, òrgans, aparells i sistemes. A més, degut a la complexitat del tema devíem intentar aprofundir en l'estructura de l'ADN, què són els gens, etc.

Pel que fa secundària vaig consultar el Decret 51/2018, del 27 d'abril, del Consell [24] vaig observar els continguts dels alumnes de 4rt d'ESO, i vaig deduir que el tema en que s'emmarca el projecte es troba al bloc II: L'evolució de la vida. En aquest bloc, veuen l'ésser viu com a sistema, la teoria cel·lular, les molècules de la vida, enginyeria genètica, bioètica i teories de l'evolució. Concretament, el CRISPR correspon a l'apartat d'enginyeria genètica, però també implica que hi haja una base prèvia per tal d'entendre els coneixements, tal i com és la teoria cel·lular, les molècules de la vida, la teoria de l'evolució i, a més, també implica qüestions bioètiques.

2.2 CONCEPTE A TRANSMETRE: *quin és el concepte, idea bàsica o contingut essencial sobre el que es va a treballar?*

Aquest projecte té com a finalitat augmentar el coneixement dels alumnes d'ensenyaments pre-universitaris sobre què és la biotecnologia, centrant-se en què és el CRISPR-Cas9, com funciona, les seues possibles aplicacions i les diferents discussions ètiques que sorgeixen degut al seu us. Aquest objectiu s'aconseguirà fent que els alumnes de secundària es converteixen en els professors, i que aquests preparen junt a l'alumne universitari una "escape room" amb les proves que permeten transmetre tots els seus coneixements apresos als alumnes de primària, els quals realitzaran aquesta activitat.

Idea principal: Entendre la tècnica molecular del CRISPR, per a aconseguir-ho s'ha preparat una "escape room" amb proves que els van proporcionant les nocions bàsiques que necessiten per tal d'entendre la tècnica.

Paraules clau: ApS, ABP, Projecte Natura, CRISPR-Cas9, edició genètica, replicació, transcripció, traducció, ADN, ARN, endonucleasa, PCR, "knockout".

2.3 OBJECTIUS: *què pot aportar en eixe sentit el nostre projecte, què esperem obtenir del desenvolupament del projecte?*

PRIMÀRIA:

- Objectiu didàctics:
 - Estimular la curiositat i introduir-los al món de la ciència, centrant-se especialment en donar a conèixer la biotecnologia.
 - Fomentar el treball en equip i l'enginy jugant en la "escape room".
 - Millorar la comunicació amb els estudiants de secundària i de la universitat.
- Objectiu científics:
 - Aprendre les aplicacions útils que la ciència aporta.
 - Conèixer la tècnica molecular CRISPR.
 - Participació en la "escape room" realitzada pels alumnes de 4rt d'ESO per aprendre les aplicacions del CRISPR-Cas9.

SECUNDÀRIA:

- Objectiu didàctics:
 - Apropar als alumnes coneixements complexos d'una forma senzilla.
 - Desenvolupament de la creativitat l'enginy i el treball en equip.

- Adquisició de la capacitat de raonar i reflexionar sobre el debat ètic que l'ús d'aquesta tècnica pot generar.
- Fomentar la relació entre els alumnes de secundària i altres nivells educatius, tal i com són la universitat o l'educació primària.
- Capacitat de disseny d'una "escape room" per tal de transmetre els seus coneixements adquirits a un nivell educatiu inferior.
- **Objectiu científics:**
 - Donar a conèixer els diferents estudis de ciències als alumnes d'ESO, que han de decidir prompte el batxillerat que han de prendre per continuar els seus estudis.
 - Aprenentatge i comprensió de la tècnica molecular reforçant al mateix temps tot allò que han vist a classe.
 - Desenvolupar la capacitat de transmetre els seus coneixements a alumnes no especialitzats amb la biotecnologia i el CRISPR.

2.4. COMPETÈNCIES BÀSIQUES

- Saber què és la biotecnologia.
- Saber com va ser el descobriment del CRISPR.
- Entendre la tècnica molecular del CRISPR.
- Saber les aplicacions que aquesta tècnica pot proporcionar.
- Debatre sobre els usos i aplicacions que aquesta tècnica comporta.

3. MATERIALS I METODOLOGIA

Materials:

- TIC (tecnologies de la informació i comunicació) com ara kahoots, survey mokey i tablets.
- Cartolines de distints colors, tisores i pegament.
- Fil d'aram de colors.
- Microscopi.
- Maquetes de cèl·lules.
- Càmera de vídeo i micròfon.
- Candats.
- Caixes per obrir amb enginy.
- Caramels.

- Material pràctica de laboratori UV: Pipetes, enzims de restricció, tampó, aigua, plasmidi, gel d'agarosa i cubeta per a dur a terme l'electroforesi.
- Pràctica de laboratori al col·legi Ave Maria: Pipetes Pasteur, mostres de llevat, porta i cubre.

Metodologia:

Han sigut diverses les metodologies emprades en aquest projecte:

S'ha emprat la metodologia d'aprenentatge servei o ApS. Aplicat al cas del nostre TFG l'ApS consisteix en assolir coneixements sobre el CRISPR i transmetre les idees bàsiques d'aquest als alumnes d'etapes preuniversitàries. D'aquesta forma, totes les etapes educatives desenvolupen nous coneixements de forma dinàmica. En altres paraules, l'ApS és un projecte on els participants es formen treballant sobre coneixements del seu entorn amb l'objectiu de transmetre-lo.

També ha sigut emprada la metodologia d'aprenentatge basat en projectes, la qual permet als alumnes adquirir coneixements i competències clau a través de l'elaboració de projectes que donen resposta a problemes de la vida real. A més, es desenvolupen altres competències com el pensament crític, la comunicació, la col·laboració o la resolució de problemes.

Un altra metodologia aplicada en determinades seccions d'aquest projecte natura ha sigut l'aprenentatge cooperatiu, el qual consisteix en treballar en equips de 3-6 persones on cada membre té una funció determinada però tots tenen el mateix objectiu final en comú, aconseguint així una millora en l'atenció, la implicació i l'adquisició de nous coneixements per part dels alumnes.

S'ha intentat realitzar les proves d'avaluació emprant la metodologia de la gamificació, és a dir, la integració de mecàniques dinàmiques pròpies de jocs o videojocs, com ara el kahoot.

I per últim, també s'ha emprat la metodologia carrusel, la qual consisteix en que els alumnes vagen passant per diverses estacions o llocs i desenvolupen per parelles o equips l'activitat assignada. Aquesta metodologia s'aplica a la "Escape room" on cada alumne ha d'anar a un lloc per tal de realitzar una activitat o prova diferent.

Lloc i /o requeriments d'espai:

- Primària: Per realitzar la “Escape room es necessita quasi totes les instal·lacions del col·legi.
- Secundària: S’ha necessitat un laboratori de la Universitat de València per portar a terme una pràctica que els ha proporcionat coneixements per entendre el CRISPR i tot col·legi per tal de muntar i realitzar la “Escape room”.

4. DESCRIPCIÓ DETALLADA

SECUNDÀRIA

Sessió I (11 de febrer)

Presentació de la biotecnologia i del CRIPR-Cas9, per tal que entengueren millor la tècnica, com es va descobrir aquesta i les seues aplicacions. A l’annex es troba el power point que vaig emprar en aquesta sessió (annex 2). Seguidament, vaig intentar obrir un debat ètic preguntant fins quin punt ells modificarien als seus fills, si sols canviarien les diverses malalties que podrien heretar per a tindre fills saludables o si també voldrien canviar el seu aspecte físics i/o intel·lectual. Pense que aquesta sessió va ser molt enriquidora per a ells culturalment, ja que van descobrir què és la biotecnologia, les aplicacions que aquesta té i com aquestes estan presents en el seu dia a dia i a més a més, van descobrir que la ciència espanyola existeix donant-los a conèixer a Francis Mojica, i es van familiaritzar amb la tècnica de CRISPR, de la que tot el món parla i totes les controvèrsies que aquesta comporta. També cal esmentar que els alumnes semblaven molt interessats i participatius en aquesta sessió.

Sessió II (12 de febrer)

En la segona sessió, vam pensar quines proves aniríem realitzant per a elaborar la “escape room”, es va desenvolupar una narrativa per a aquesta on els alumnes de 4rt d’ESO realitzant una pràctica de laboratori de la facultat de biologia son infectats per un retrovirus (tipus de virus que té com a material genètic ARN, després d’infectar una cèl·lula hoste, empra un enzim anomenat transcriptasa inversa per a transcriure reversament l’ARN a ADN. A continuació, el retrovirus integra el seu ADN en l’ADN de la cèl·lula hoste, que li permet multiplicar-se) que insereix part del seu ADN en l’ADN de l’hoste, provocant una mutació en el seu ADN, per tal de curar aquesta mutació hi ha que portar a terme un CRISPR-Cas9 que talle l’ADN del virus inserit en l’ADN dels

infectats. Cada volta que es supere una prova es dona una lletra, quan acaben totes les proves aquestes lletres formaran una paraula que els dirà el lloc on han d'acudir per trobar totes les eines per portar a terme un CRISPR-Cas9 i així poder salvar als alumnes de 4rt d'ESO.

Per tal de realitzar-lo, els alumnes de 5è de primària deuen realitzar 7 proves distintes amb diverses preguntes relacionades amb la seua assignatura de ciències naturals. Segons el Decret 108/2014 del 4 de juliol del Consell [25], la temàtica del nostre projecte pertany al bloc III del curs, anomenat "Els sers vius" on aprofundeixen en l'estructura interna dels éssers vius: cèl·lules, teixits, òrgans, aparells i sistemes. A més, degut a la complexitat del tema devíem intentar realitzar proves en les que apreneren l'estructura de l'ADN, que són els gens, etc. Per a dur a terme el disseny es va dividir la classe en diversos grups on cada ú treballava en una prova, és així com vam elaborar les següents proves:

1. **Prova 1.** Vídeo on s'explica què els ha passat als alumnes de 4rt d'ESO realitzant la pràctica de laboratori i on els demanen ajuda per realitzar un CRISPR.
2. **Prova 2.** La prova consisteix en enfocar preparacions als microscopis.
3. **Prova 3.** Tallar l'ADN d'un infectat amb enzims de restricció i comparar l'ADN del infectat amb l'ADN dels sospitosos infectats (ja proporcionat) mitjançant una electroforesi en paper. D'aquesta manera aprenen a tallar DNA (diferències entre tall amb enzims de restricció i enzims CRISPR) i a llegir i comparar gels electroforètics.
4. **Prova 4.** Construir una molècula d'ADN seguint una seqüència que els donem prèviament. D'aquesta forma els alumnes poden entendre de manera pràctica què és l'ADN i per quins elements està format.
5. **Prova 5.** Consisteix en relacionar seqüències d'ADN amb caràcters físics. Amb aquesta prova es vol donar a entendre que els gens ens defineixen tal i com som, és a dir, ens aporten caràcters físics i psíquics que ens fan ser diferents a altres, com ara els diferents colors d'ulls.
6. **Prova 6.** Amb les maquetes de les cèl·lules eucariota i procariota deuran relacionar les distintes parts amb les funcions d'aquestes i les diferències entre ambdues cèl·lules. Així és com aconseguim que aquests alumnes coneguen els elements de les cèl·lules i els dos tipus que hi ha.
7. **Prova 7.** El alumnes uniran totes les lletres obtingudes en les altres proves i així és com trobaran el **kit** amb totes les eines per a portar a terme el CRISPR als

alumnes de 4rt d'ESO i eliminar el virus inserit al seu genoma. Al kit es troben les següents eines:

- a. **L'ADN dels estudiants** (infectat pel virus), l'ADN s'ha representat tan sols amb una cadena en lloc d'ambdues per fer l'apariament més senzill.
- b. **La seqüència de l'ADN del virus**, el qual funciona com gARN, però no s'ha realitzat amb ARN degut a la complexitat d'entendre la complementació entre ARN i ADN. Tampoc s'ha realitzat la complementarietat amb l'ADN dels estudiants, s'han emprat les mateixes bases amb els mateixos colors.
- c. Les tisores moleculars anomenades **Cas9**.

Per últim els alumnes hauran de comparar les seqüències d'ADN de l'infectat i el virus, seguint el criteri de complementarietat per així poder trobar el lloc que hi ha que eliminar i realitzaran el tall, i per tant, la inactivació del virus amb les tisores moleculars Cas9.

En aquesta sessió, una volta ideades les proves, vam dividir-los per grups per a que d'encarregara de a preparar-les amb cartolina, tisores i pegament.

Sessió III (14 de febrer)

En aquesta sessió els alumnes de 4rt d'ESO han vingut a la facultat de biologia per tal de realitzar una pràctica de laboratori. L'objectiu d'aquesta pràctica era que aprengueren a pipetejar volums molt menuts, entengueren: com digerir ADN amb enzims de restricció i la diferència que hi ha entre emprar aquests o el enzims del CRISPR com és la Cas9, que aprengueren què és una electroforesi, per a què serveix i com interpretar els resultats que s'obtenen. A més, també s'han explicat les mesures de precaució que hi ha al laboratori i també s'ha intentat que entengueren que no tot és com els dibuixos que apareixen als llibres de biologia que estudien.

Per a aconseguir aquests objectius hem realitzat una pràctica senzilla (annex 3) on han digerit un ADN amb enzims de restricció, s'ha elaborat un gel d'agarosa i s'han carregat els productes de digestió en aquest per tal de veure la separació de les bandes. Els resultats que s'han obtingut han sigut els que calia esperar, pel que s'han complit els objectius que volíem. En la següent imatge es pot comprovar els resultats de la digestió:

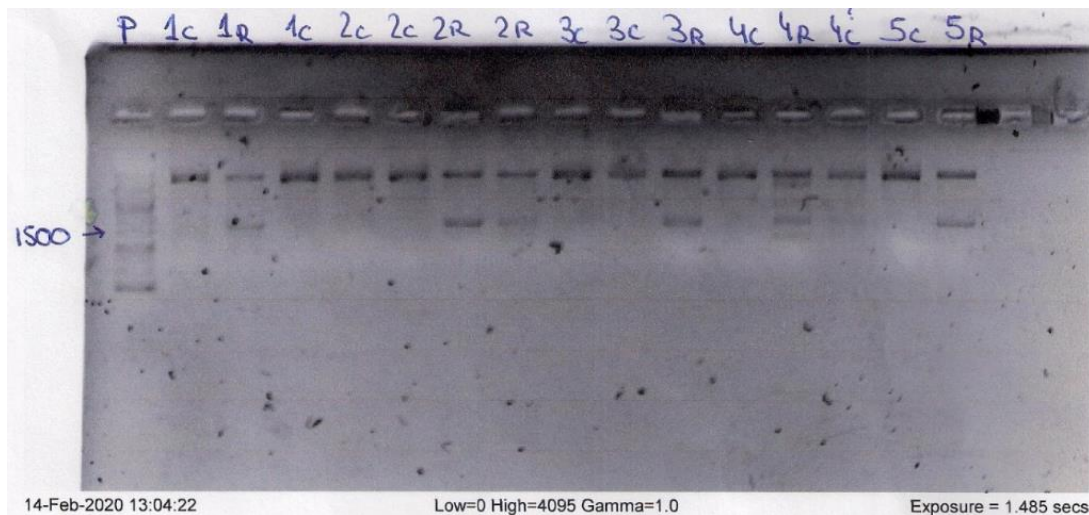


Figura 4. Imatge on es comprova si la digestió duta a terme pels alumnes ha estat correcta o no. El número del 1 al 5 representa el nombre del grup que va a portar a terme la digestió. La P significa patró, la C control i la R restricció.

Per la vesprada, hem realitzat una “escape room” a Clue Hunters Valencia per tal de fer-nos una idea de com elaborar la nostra i adquirir alguna idea nova.

PRIMÀRIA

Aquesta fase ha suposat tot un repte, ja que els coneixements del CRISPR son prou complexos per a adaptar-los a un nivell de 5è de primària. En aquesta etapa he volgut centrar-me en la part d’investigació bàsica que va fer Francis Mojica centrant-me en que CRISPR està compost per una endonucleasa, la Cas9 que actua com unes tisores moleculars, aquesta quan detecta que el genoma de un virus està dins del bacteri, s’activa i el talla inactivant-lo. A més, he volgut transmetre algunes de les aplicacions que aquesta tècnica té tal i com curar malalties.

Sessió I (6 de març)

Els alumnes de 4rt d’ESO, Pascual i jo hem anat a la classe de 5è de primària per a fer una xicoteta introducció sobre què és l’ADN, què son els bacteris, els virus i què és el CRISPR. A part de realitzar una xicoteta explicació, els alumnes han aprofitat per fer preguntes com: Què és una vacuna? Aquesta tècnica es pot fer en persones? On va a parar el ADN que és tallat i per tant inactivat?

Per tal de fer aquestes explicacions introductòries he elaborat una maqueta d’un ADN amb caramels i aprofitant aquesta s’ha explicat la complementarietat de bases de l’ADN.

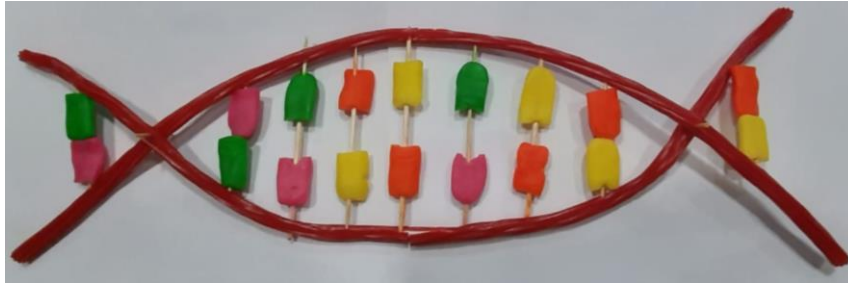


Figura 5. Fotografia de l'ADN elaborat per mi amb caramels per tal de poder explicar als alumnes de primària l'estructura de l'ADN i la complementarietat de bases.

També els hem reproduït un xicotet vídeo explicatiu de la tècnica [26] i explicat que el proper dia van a tindre que ajudar-nos i participar en una activitat i que per a dur-la a terme amb èxit tenien que estar atents a la explicació.

Sessió II (10 de març)

Realització dels últims detalls de la “escape room”: vídeo, proves, coordinació d'aquestes, etc. Coordinació de tots els grups i adequació de com serà cada prova individual per tal de concretar detalls sobre aquestes.

Sessió III (11 de març)

La tercera sessió ha consistit en una pràctica de laboratori amb els alumnes de 5è on han preparat una mostra de llevat per a observar al microscopi. L'objectiu de realitzar aquesta pràctica era que els alumnes adquiriren coneixements sobre com manejar-lo per tal de realitzar la prova 2 de la “escape room”, a més també va servir per tal d'introduir altres conceptes relacionats amb la biotecnologia.

Seguidament els hem ensenyat com emprar el microscopi i enfocar la seua preparació. A més a més, se'ls ha explicat el funcionament molecular del llevat per tal de fer pa, pastissos, etc. i el seu tipus de reproducció.



Figura 6. Imatge al microscopi del llevat. On s'observa que es divideixen per gemmació (reproducció asexual on la cèl·lula mare produeix dos cèl·lules filles per escissió). Font: <https://articulo.mercadolibre.com.ar/MLA-743234795-microscopio-olympus-ch-pto-conteo-levaduras-para-cerveceria- JM>

Funcionament molecular del llevat:

Primerament, he preguntat si saben per a què serveix el llevat? Els xiquets m'han contestat que és un compost que s'utilitza per a fer pa, pastissos o bescuits. Aprofitant aquestes respostes he preguntat si saben la funció que té el llevat en l'elaboració d'aquests productes i alguns xiquets m'han contestat que és per a que "el pastís pugui".

A continuació, he definit què és el llevat, un organisme viu i unicel·lular que realitza la fermentació d'hidrats de carboni i que es divideix per gemmació (tipus de reproducció asexual que ocorre quan una cèl·lula mare origina dues cèl·lules filles de diferents dimensions). També, he aprofitat per explicar que la causa de que el pastís augmente de volum és deguda a aquesta fermentació que poden dur a terme, ja que, el llevat es "menja" (metabolitza) el sucre alliberant CO_2 , el qual s'allibera en forma de bombolles fent que augmente el volum del pastís. Seguidament, els he explicat que això és el que anàvem a observar, és a dir, anàvem a poder observar com el llevat es reproduïx, podent apreciar boletes úniques o dues boletes juntes de distintes grandàries que representen a la mare i a la filla.

Sessió IV (2 d'abril)

Aquesta sessió s'anava a dedicar a construir tota la "escape room" físicament i la realització d'un xicotet simulacre on els professors realitzarien totes les proves per tal de nosaltres poder cronometrar els temps de cada prova i a més perquè aprengueren què és el CRISPR.

No ha pogut ser realitzada degut al COVID-19, ja que totes les classes al col·legi han sigut cancel·lades per evitar el contagi.

Sessió V (3 d'abril)

Realització de la "escape room":

1. **Prova 1.** Els alumnes de 5é es troben en la classe de 4rt d'ESO, aquests els demanen que resolguen un jeroglífic per tal de trobar la combinació del candat que guarda la informació per contar-los la situació en la que es troba el col·legi.

$$\text{😊} + \text{😊} = \underline{4}$$

$$\text{😊} + \text{⚡} = 5$$

$$\text{😊} + \text{🌙} = \text{⚡}$$

$$\text{⚡} + \text{🌙} + \text{😊} = \text{❤️}$$

Una volta solucionat han d'obrir la caixa tancada pel candat, i així és com trobaran una tablet amb un vídeo on s'explica què els ha passat als alumnes de 4rt d'ESO realitzant la pràctica de laboratori, en ell se'ls explica com s'han infectat els alumnes pel virus, que estan tancats al centre (alumnes de 4rt d'ESO i 5é de primària) i per poder eixir deuen trobar el kit amb les eines per realitzar el CRISPR als seus companys.

Després de visualitzar el vídeo es formarien 4 grups amb un monitor de 4rt d'ESO designat per a cada un que els acompanyarà i proporcionarà ajuda si cal durant totes les proves. Seguidament, s'enviarà als alumnes a la sala d'exàmens on han de trobar la caixa de fusta que al seu interior guarda l'itinerari que ha de recórrer cada ú dels grups i el criteri de complementarietat de bases de l'ADN. Una volta obert aquest candat, els alumnes torbaran una fulla amb un ordre i endevinalles de forma que han d'anar resolvent aquestes endevinalles seguint l'ordre esmentat per tal de realitzar de forma coordinada amb tots els grups les distintes proves. Endevinalles:

- Lloc del col·legi que conté més lletres → Biblioteca.
- Lloc amb més ritme del col·legi → Aula de música.
- Zona 0 → Laboratori.
- Lloc més nou situat al segon pis → Aula nova.
- Lloc que coneixen molt bé → L'aula dels alumnes de 5é.

Representació dels 4 itineraris distints elaborats per a cada un dels grups que els alumnes troben en la caixa de fusta.

RECORREGUT

Grup 1:

4rt ESO
 Zona 0
 Lloc en més ritme del col·legi
 Lloc que conegueu molt bé
 Lloc més nou situat al 2n pis
 Lloc del col·legi que conté més lletres
 ¿-----?

RECORREGUT

Grup 3:

4rt ESO
 Lloc que conegueu molt bé
 Lloc més nou situat al 2n pis
 Lloc del col·legi que conté més lletres
 Zona 0
 Lloc en més ritme del col·legi
 ¿-----?

RECORREGUT

Grup 2:

4rt ESO
 Lloc en més ritme del col·legi
 Lloc que conegueu molt bé
 Lloc més nou situat al 2n pis
 Lloc del col·legi que conté més lletres
 Zona 0
 ¿-----?

RECORREGUT

Grup 4:

4rt ESO
 Lloc més nou situat al 2n pis
 Lloc del col·legi que conté més lletres
 Zona 0
 Lloc en més ritme del col·legi
 Lloc que conegueu molt bé
 ¿-----?

Criteri de complementarietat que els alumnes troben a la caixa de fusta:

A → **T**

G → **C**

D'aquesta forma cada grup es dirigirà a una aula diferent per a realitzar la que seria la seua prova 2 i aconseguir a poc a poc les lletres per a saber on està amagat el kit amb els elements més importants per realitzar el CRISPR i salvar als seus companys de 4rt.

2. **Prova 2.** La prova transcorre al laboratori on un alumne de 4rt no infectat els proporciona una preparació que han d'enfocar al microscopi, tal i com se'ls va ensenyar en una pràctica. En aquesta prova deuen emprar els coneixements adquirits a la pràctica realitzada prèviament. Obtenció de la lletra C1.
3. **Prova 3.** Per a realitzar aquesta prova els alumnes s'han de dirigir a l'aula de música. En aquesta prova l'alumne de 4rt els explicarà que saben que hi ha un altre infectat però no saben qui és, per tal de identificar a aquest subjecte deuen fer diverses coses:

- a. Primerament els alumnes hauran d'aconseguir el paper de l'electroforesi de l'ADN dels sospitosos, una volta aconseguida han de tallar l'ADN de la imatge superior esquerra (Figura 7) que correspon a l'ADN d'una persona infectada amb seguretat. Per poder tallar, necessiten la tisora EcoRI i la seqüència de la imatge esquerra inferior que correspon a la seqüència que reconeix on ha de tallar l'enzim de restricció EcoRI.

Els alumnes hauran de tallar la seqüència de l'infectat i col·locar-la al seu lloc corresponent al paper de l'electroforesi (la part en gris no estarà present, és la que ells han de col·locar). En la imatge de l'esquerra s'observa l'electroforesi, segons la grandària els alumnes han d'identificar al sospitós infectat (l'infectat és el sospitós 2 perquè la grandària de les seqüències d'ADN coincideix). Al superar aquesta prova obtenen la lletra E3.



Figura 7. Imatge 7a) representa l'ADN del infectat. La imatge 7b) representa la seqüència que talla l'enzim de restricció EcoRI. A la imatge 7c) es representa un gel d'electroforesi amb les seqüències dels sospitosos digerides.

4. **Prova 4.** La prova ocorre a l'aula dels alumnes de 5è de primària on els alumnes deuen trobar el bolígraf amb llanterna amb aquest deuran d'il·luminar el paper on es troba una seqüència d'ADN escrita amb tinta invisible. Els alumnes deuran seguir aquesta seqüència per tal de construir un ADN amb un fil d'aram de colors. Obtenció de les lletres A4.

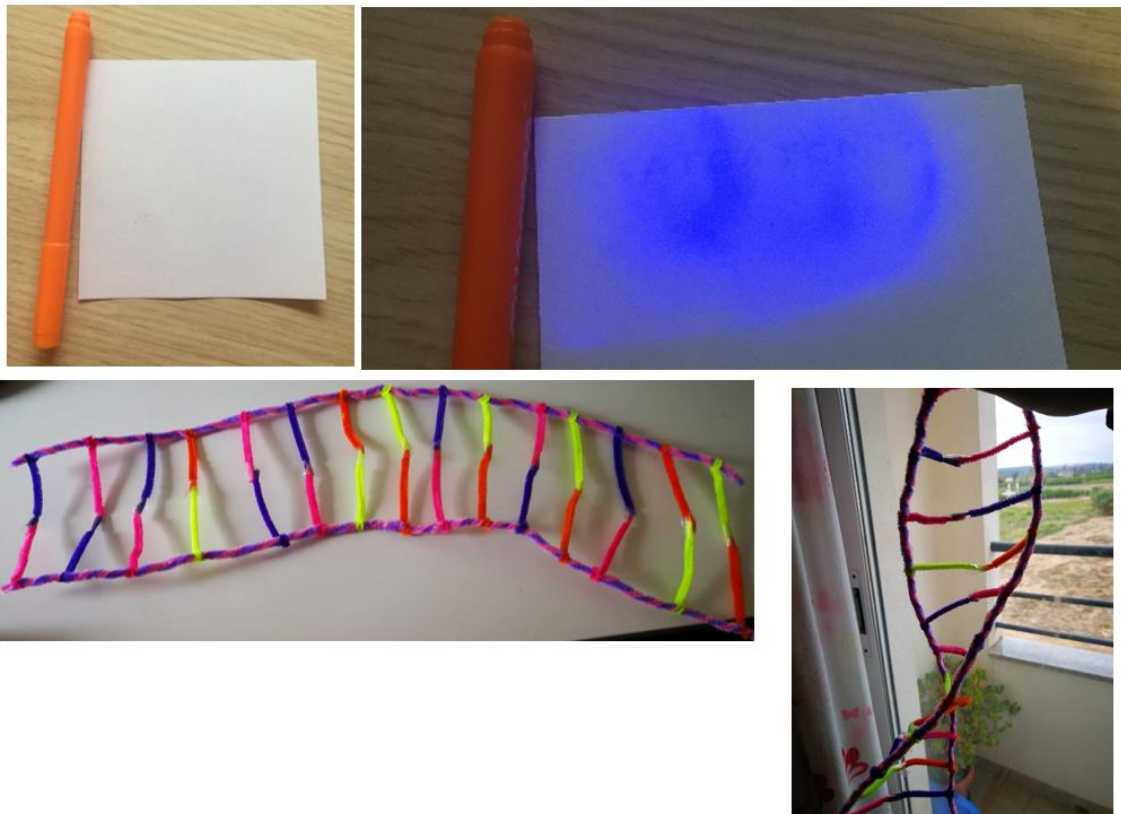


Figura 8. Imatge superior esquerra s'observa un paper en blanc, en canvi al il·luminar amb la llanterna especial es pot distingir una seqüència d'ADN (imatge superior dreta) que és la que els alumnes deuen seguir per tal de construir l'ADN desitjat (imatges inferiors).

5. **Prova 5.** Aquesta prova es du a terme en l'Aula nova, allí un alumne de 4rt els amagarà dos seqüències d'ADN corresponents al infectat, les quals li confereixen 2 caràcters físics, color dels cabells i el color dels ulls. Els alumnes de 5è deuran relacionar les seqüències d'ADN trobades amb els caràcters físics i amb les imatges que hi ha a l'aula, així és com descobreixen qui és l'altre infectat. Obtenció de les lletres LL4.



		COLOR D'ULLS
		CTGATC <small>BLAU</small>
		AGTTCC <small>VERD</small>
		GACTCT <small>MARRÓ</small>
		COLOR DELS CABELLS
		TCGACG <small>RUBIO</small>
		CAGTGA <small>MARRÓ</small>
		ATTCCGG <small>NEGRE</small>
		GCTAAT <small>ROIG</small>

6. **Prova 6.** Prova a la biblioteca on els alumnes trobaran a un alumne de 4rt que els ajudarà a trobar un llibre que conté unes fitxes amb noms d'òrgànuls i diverses funcions d'aquests que hauran de relacionar amb les maquetes de les cèl·lules eucariota i procariota. Obtenció de les lletres AP2.



Figura 9. Maquetes elaborades pel col·legi Ave Maria en un Projecte Natura previ. Representa la cèl·lula l'animal (a l'esquerra) i la vegetal (a la dreta).

7. **Prova 7.** El alumnes uniran totes les lletres seguint els números junt a elles, obtinguent així la paraula CAPELLA i allí es on es dirigiran per trobar el kit amb totes les eines per a portar a terme el CRISPR als alumnes de 4rt d'ESO. Al kit es troben les següents eines (Figura:

- a. L'ADN dels estudiants (infectat pel virus).
- b. La seqüència de l'ADN del virus, el qual funciona com gARN.
- c. Les tisores moleculars Cas9.

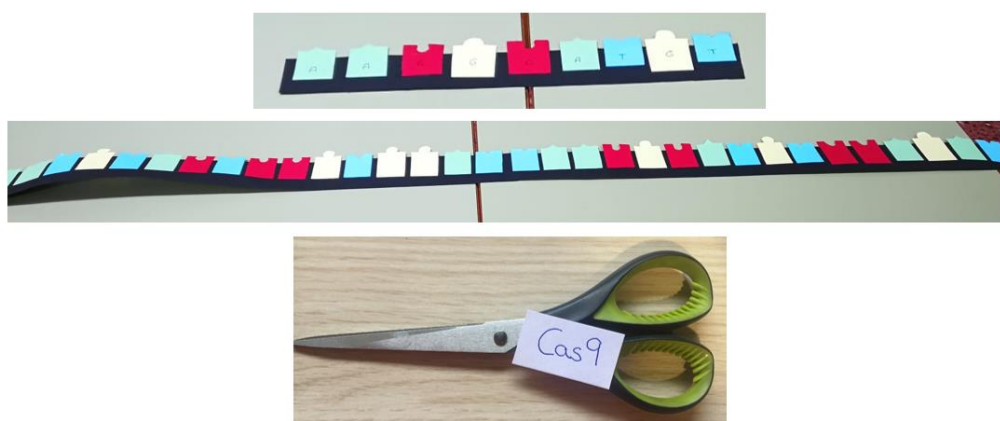


Figura 10. Imatge superior representa l'ADN del virus, la imatge del mig representa l'ADN de l'infectat i la imatge inferior son les tisores moleculars Cas9.

Amb aquests elements els alumnes deurien de comparar l'ADN del virus amb l'ADN dels infectats, detectar on es troba inserit el virus i amb les tisores moleculars Cas9 tallar-lo, fent-lo inactiu i així curar als seus companys.

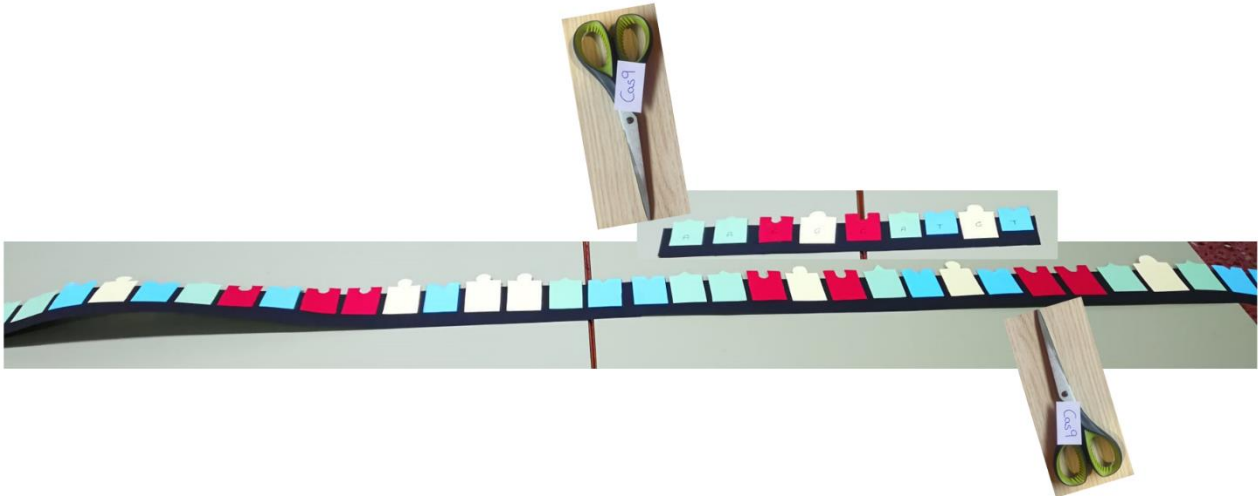


Figura 11. Realització del CRISPR. En la imatge s'observa com gràcies a l'ADN del virus podem trobar quina part de l'ADN humà està infectat i tallar-lo amb la Cas9 *.

* La cadena de l'ADN del virus que hi ha a la imatge deuria de ser d'ARN i complementaria a l'ADN, ens hem vist obligats a perdre un poc de rigor científic per facilitar la comprensió dels alumnes.

Aquesta activitat tampoc ha pogut ser realitzada degut al COVID-19, a pesar d'estar totalment preparada.

5. CONCLUSIONS

Principals conclusions extretes per l'equip en el procés d'elaboració del projecte

S'han obtingut nous materials per a explicar la biotecnologia i el CRISPR, com ara: power points, un vídeo explicatiu, maquetes de caramels i activitats de la "escape room", les quals es poden realitzar conjuntament o per separat. Però, a part dels nous recursos creats, s'ha comprovat que aquests son efectius mitjançant els següents gràfics.

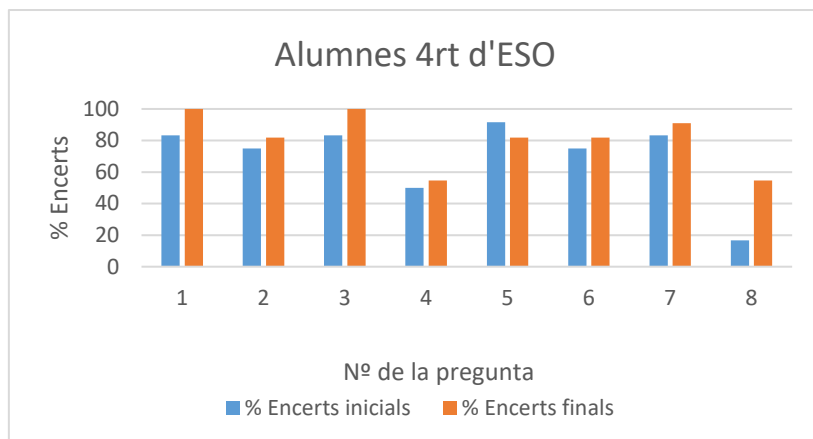


Figura 12. Gràfic on es compara el percentatge d'encerts inicials i finals dels alumnes de 4rt d'ESO. Font: Gràfic realitzat amb Excel dels resultats obtinguts a través del Kahoot inicial i el Survey Monkey final.

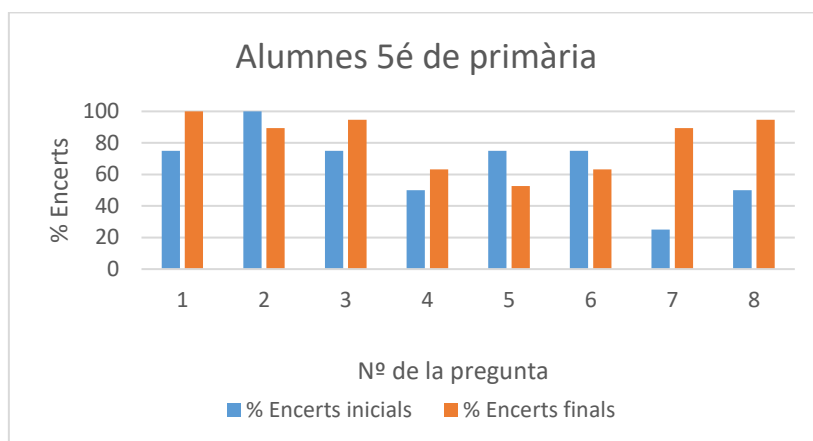


Figura 13. Gràfic on es compara el percentatge d'encerts inicials i finals dels alumnes de 5é de primària. Font: Gràfic realitzat amb Excel dels resultats obtinguts a través del Kahoot inicial i el Survey Monkey final.

Conclusions dels alumnes:

Alumnes de primària

Els alumnes de primària, van valorar les explicacions i activitats proporcionades de l'1 al 10 i els vaig deixar que escrigueren en una casella alguna suggerència, millora o el que més els havia agradat de l'experiència. Dels 19 alumnes que van respondre varen valorar el projecte amb una mitja de 9,53. En quan a suggerències i millores vaig rebre:

“La pràctica del laboratori amb el llevat va estar molt guay”

“Era un poc difícil d'entendre”

Alumnes de secundària

Al igual que amb els alumnes de primària es va demanar que avaluaren de l'1 al 10 les explicacions, activitats, etc. i escrigueren qualsevol observació al requadre. Dels 11 alumnes que van respondre avaluaren el projecte amb una mitja de 9,82, i al requadre de comentaris vaig trobar:

“L'experiència ha suposat una forma diferent i divertida d'aprendre nous conceptes, una llàstima que no s'haja pogut realitzar l'activitat final”

Conclusions de l'equip docent:

Tutora del TFG: Inmaculada Quilis Bayarri

Com a tutora del TFG de Clara i supervisora del Projecte Natura desenvolupat, he de manifestar la meua satisfacció per la valentia de Clara d'estar disposada a afrontar el repte de transmetre idees tan complexes com els fonaments de la tècnica de CRISPR a nivells educatius preuniversitaris, per la forma com ho ha fet amb humilitat, senzillesa i de forma divertida, i per la qualitat dels materials generats que segur que seran aplicats en el centre i en molts altres centres quan les circumstàncies ho permeten. Clara ha treballat de forma autònoma i responsable i ha consultat només per tindre la seguretat de mantindre en tot moment el rigor científic que requeria el tema. L'equip ha conecat molt bé i això ha permés una relació fluida i un molt bon clima de treball. Crec que aquest treball li ha permés a Clara i als alumnes que han treballat amb ella ser coneixedors de la revolució biotecnològica dels últims anys i saber parlar de forma crítica sobre ella. Finalment voldria afegir que Clara ha hagut de viure la crisi provocada pel COVID-19 abandonant Itàlia abans de l'esperat i adaptant-se a les restriccions després ací en Espanya, i en cap moment ha baixat el seu ritme de dedicació al projecte. A més ha pogut acompanyar amb informació fiable als alumnes amb els que estava treballant. Crec que per tot l'enumerat ha fet un gran treball i pronostique que seria una bona docent i divulgadora científica en el futur.

Professor de secundària: Pascual Hernández

El curs 2019/2020 es presentava interessant. Un any més havia fet la inscripció per a que el meu col·legi Ave Maria de Carcaixent participarà en els Projectes Natura. La possibilitat que la Facultat de Ciències Biològiques ens proporciona als col·legis

d'Educació Secundària i als professors de Biologia és una oportunitat magnífica per a millorar i realitzar coses diferents.

Aquest curs Inma em va suggerir realitzar un Projecte Natura que tutoritzava ella en el que participava una alumna que estava realitzant l'últim curs de Biotecnologia. El tema sobre el que anàvem a treballar era la innovadora tècnica del CRISPR-Cas9. El tema ja era complex per a adaptar-lo als coneixements d'alumnes de 4t d'ESO, però encara era més difícil si els coneixements que tenien que adquirir els alumnes de 4t teníem que posar-los a l'abast dels alumnes de 5é de Primària.

Però hi havia alguna que altra dificultat més, l'alumna que anava a fer el projecte amb nosaltres era Clara Bou i estava fent l'últim curs de biotecnologia a Milan, gaudint d'un projecte d'Erasmus.

El repte era més que atractiu. Teníem que aconseguir adaptar els continguts tant elevats a un nivell de 4t d'ESO i després adaptar-los a 5é de Primària i a més a més salvar un miler de quilòmetres que ens distanciava de la persona que tenia que desenvolupar el projecte.

Encara que tot el que hem mencionat anteriorment pareixia que anava a proporcionar-nos dificultats, res més lluny de la realitat. En novembre iniciarem els nostres contactes via e-mail i tot va començar a rodar d'una manera molt fluida. Cap a mitjan de novembre després de debatre (Inma, Clara i jo), com enfocàvem el Projecte per a que els continguts foren accessibles als alumnes i a la volta atractius, decidírem fer un Scape en el Col·legi. La nostra temàtica va ser premonitòria (desgraciadament), pensarem en que hi havia un virus al col·legi que havia infectat a alguns alumnes i els alumnes de cinquè tenien que superar una sèrie de proves (preparades conjuntament per Clara i els alumnes de 4t d'ESO) per a salvar el col·legi .

Després de Nadal (7 de gener) va arribar l'esperat dia per part dels alumnes de 4t d'ESO i Clara va vindre al col·legi per a presentar-se i fer la primera presa de contacte.

Quan Clara va tornar al col·legi a principis de febrer va explicar als alumnes de 4t el tema de manera magistral. Ens va explicar en que consistia la tècnica de CRISPR-Cas9, quines possibles aplicacions tenia i com Francis Mojica ho va descobrir. La veritat és que tant els alumnes com jo ens vam quedar ben assabentats de quasi tot el referent a aquesta tècnica. Ara ja teníem la part teòrica només calia pensar en com tots aquests conceptes

d'Enginyeria genètica tant complexos podíem fer que foren assequibles per als alumnes de 5é de primària.

I ens vam posar a fer feina. Pensarem com podríem enfocar la situació. Teníem que elaborar un Scape Room a nivell del col·legi, els alumnes de 4t s'han infectat per un virus i els alumnes de 5é tenen que anar superant una sèrie de proves per a trobar al final la cura a aquest virus que seria el CRISPR-Cas9 que tallaria i destruiria el virus curant als infectats i salvant el col·legi.

Clara juntament amb els meus alumnes m'han sorprès (una vegada més i ja van no se quantes) per la gran quantitat de proves que han anat suggerint. A més a més hem elaborat una trama al voltant de l'Scape amb vídeos gravats i editats.

Aprofitant la situació els alumnes de 4t d'ESO dirigits per l'alumna de biotecnologia Clara han realitzat dues sessions en els alumnes de 5é de primària en les que els han ensenyat les nocions bàsiques del que és un virus, el què és el ADN i unes nocions molt bàsiques de què és el que fa la tecnologia del CRISPR-Cas9.

Fent una valoració general l'execució del Projecte (fins on el Coronavirus ens ha deixat arribar) ha sigut perfecta. Els alumnes de 4t d'ESO han treballat de manera magnífica, sempre molt ben dirigits i aconsellats per Clara. Estem convençuts que siga quan siga, rematarem el projecte realitzant la prova de l'Scape en el col·legi.

El treball que ha realitzat Clara ha sigut magnífic. En tot moment m'he sentit molt còmode treballant en ella. Sempre ha estat molt receptiva a qualsevol suggeriment que jo he realitzat. En l'elaboració de les distintes proves ha col·laborat en companyia dels alumnes per a realitzar les distintes fases de l'Scape. En definitiva crec que ha realitzat un fabulós treball en el Projecte i estic molt orgullós del treball que hem realitzat conjuntament.

6. VALORACIÓ DEL PROJECTE

Valoració personal: La possibilitat de participar en un projecte natura m'ha aportat moles coses positives:

En quan al nivell científic, aquest projecte m'ha permès aprendre moltíssimes coses que desconeixia sobre la tècnica del CRISPR i a més, he tingut la sort de poder emprar aquesta tècnica a un laboratori, permetent-me així ampliar els meus coneixements sobre aquesta a nivell pràctic. També he pogut aprendre sobre divulgació científica i adaptació de coneixements científics a nivells de secundària i primària aconseguint així apropar-me al

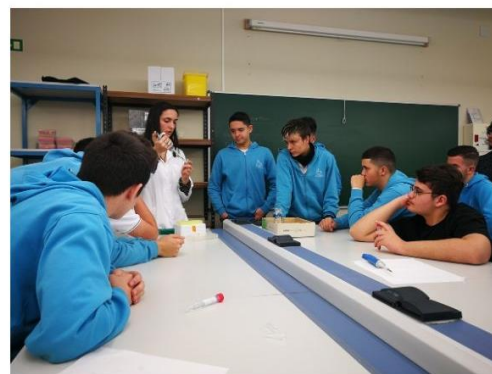
món de la docència. A més, he pogut aprendre sobre distintes TIC que s'empren per tal d'apropar-me als alumnes,

En referència a la coordinació del projecte, he reforçat les meues aptituds per a l'anàlisi i resolució de problemes, la planificació, el treball en equip, la creativitat i la innovació.

Aquest projecte ha sigut enriquidor per tal de fer entendre als alumnes la situació que estàvem vivint, ja que, inicialment els parlarem sobre què eren els virus, la seua estructura i com es reproduïen. A més, nosaltres havíem plantejat una situació hipotètica per a la nostra "escape room" on els alumnes eren infectats per un virus a principis de desembre, quan es desconeixia per complet l'existència del COVID-19. Pel que la solució que oferíem de realitzar un CRISPR-Cas9 a les persones infectades per eliminar el virus seria possible per a portar a terme algun tipus de teràpia gènica, però no es pot emprar degut a la falta de coneixement de la tècnica aplicada a humans, tal i com he comentat anteriorment a l'apartat del marc ètic i legal.

En conclusió, aquest projecte ha suposat un repte per a mi, ja que, mai havia desenvolupat i coordinat un projecte com aquest. A pesar de la dificultat del tema i de les circumstàncies, he quedat molt contenta i satisfeta amb el projecte, i espere tindre l'oportunitat de realitzar la Escape room i portar-la a l'Expociència en un futur.

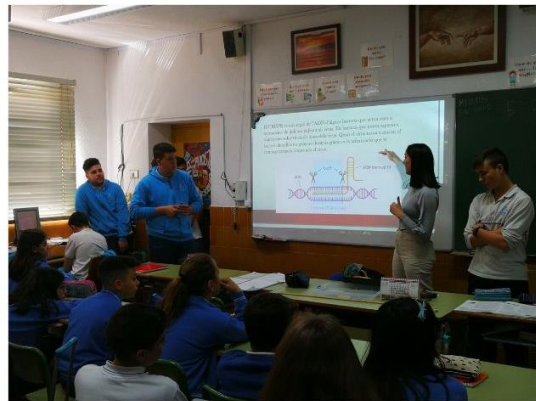
7. IMATGES DEL DESENVOLUPAMENT DEL PROJECTE





Escape room en Clue Hunters

Explicació introductoria a primària



Rodatge
del video
per a la
Escape
room

Laboratori amb els alumnes de primària i secundària



8. EXPOSICIÓ DE LES DIFICULTATS PER DESENVOLUPAR EL PROJECTE

A l'hora de desenvolupar aquest projecte m'he trobat en diverses dificultats. La primera de totes va ser que aquest any em trobe a Milà realitzant una estància anual amb el programa Erasmus, per tant, portar a terme un projecte com aquest a distància era més difícil, però vaig aconseguir resoldre-ho gràcies a les diverses voltes que vaig tornar i, per suposat, a l'ajuda i gran flexibilitat de Inma i Pascual.

Una volta programat tots els vols per a dur a terme el projecte ens vam trobar en que el tema era un poc complex per als alumnes de secundària i primària. Per part dels alumnes de secundària tot va ser més fàcil quan van estudiar i examinar-se sobre els temes d'enginyeria genètica. En quant a primària, va ser més complex, ja que, aquests no havien estudiat cap dels conceptes relacionats amb la temàtica del projecte, encara aixina es va intentar sintetitzar tot al màxim i es van fer diverses explicacions dinàmiques per a que aquests ho entengueren.

Més tard, degut a l'arribada del COVID-19 a Europa, malaltia causada pel virus SARS-CoV-2 molt contagiosa, vaig abandonar Milà, capital de regió més afectada d'Itàlia, i vaig realitzar una quarantena voluntària al tornar a València. Tres setmanes després va ser declarada la pandèmia, és per açò que no vam poder dur a terme la "escape room" ni el seu simulacre amb professors degut al tancament de l'escola. A més després, van cancel·lar l'Expociència, la qual s'anava a realitzar el 23 de maig. Aquestes últimes dificultats van ser molt desafortunades, ja que teníem tota la "escape room" dissenyada i amb una data de realització fixada (el 3 d'abril). En un futur, espere poder realitzar la "escape room" amb els alumnes i anar al proper Expociència.

L'últim dia abans de que tancaren el col·legi (13 de març) vaig tindre l'oportunitat d'estar en el col·legi realitzant la pràctica de laboratori amb els alumnes i vaig comentar-los un poc la situació del COVID-19, en què consistia i les mesures a prendre. A més, gràcies a Pascual vaig poder enviar-los una xicoteta explicació divulgativa telemàticament (annex 8). Aquesta situació em va vindre bé per a que els alumnes s'adonaren que la ciència i la investigació està present en el nostres dia a dia i que és molt necessària, és a dir, la biotecnologia és necessària per combatre problemes quotidians, la necessitem per millorar la nostra qualitat de vida, fer vacunes, teràpia gènica, etc.

9. BIBLIOGRAFIA

1. <https://www.uv.es/uvweb/centre-formacio-qualitat-manuel-sanchisguarner/ca/capsa/aps-uv/capsa-1286022919165.html>
2. Nieves Tapia, M. (2001). La solidaridad como pedagogía: El “aprendizaje-servicio” en la escuela. Editorial Ciudad Nueva.
3. Puig, J. M., Batlle, R., Bosch, C. y Palos, J. (2007). Aprendizaje servicio. Educar para la ciudadanía. Barcelona, Editoria Octaedro (1ª edición en catalán, 2006), p. 20
4. <https://projectes.dociencia.cat/index.php>
5. Wang, H., La Russa, M., & Lei S. Qi (2016). CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. *Annu. Rev. Biochem.* 85:227–64.
6. Lacadena, J.R. (2017). Genome editing: Ciencia y ética. Revista Iberoamericana de Bioética nº 03, 01-14.
7. Montoliu, L., (2019). *Editando genes: recorta, pega y colorea. Las maravillosas herramientas CRISPR*, Madrid, España: Next door publishers.
8. Ishino et al., (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*, Vol 169, No 12, p. 5429-5433.
9. Fuguo J. & Doudna, A. J. (2017). CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu. Rev. Biophys.* 46:505–29
10. Doudna, A. J. & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. Vol.346, Issue 6213: 1077-1088. Two Kyriel M.
11. Gersbach, C. et al. (2015) Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nature biotechnology*, 33, 510-517.
12. Bortesi, L. & Fischer, R., (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances* 33: 41–52.
13. Jansson, S. (2018) Gene-edited plants on the plate: the ‘CRISPR cabbage story’. *Physiologia Plantarum* 164:396-405.
14. Gantz, V. M. et al. (2015). Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112, E6736–E6743.

15. Hammond, A. *et al.* (2016). A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nat. Biotechnol.* 34, 78–83.
16. Dong, Y., Simões, M. L., Marois, E., Dimopoulos, G. (2018). CRISPR/Cas9 – mediated gene knockout of *Anopheles gambiae* *FREPI* suppresses malaria parasite infection. *PLoS Pathog* 14(3): e1006898.
17. Dong, N., Hong-Jiang, W., *et al.* (2017). Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9. *Science*, Vol. 357, Issue 6357, pp.1303-1307.
18. Charlesworth, C.T., Deshpande, P.S., Dever, D.P. *et al.* (2019). Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans. *Nat Med* 25, 249–254.
19. Ihry, J. R., Worringer, A. k., *et al.* (2018). p53 inhibits CRISPR-Cas9 engineering in human pluripotent stem cells. *Nat Med*, 24, 939-946.
20. Haapaniemi, E., Botla, S., Persson, J. *et al.* (2018). CRISPR-CAS9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. *Nat Med*, 24, 927-930.
21. Bellver, V. (2016). La revolución de la edición genética mediante CRISPR-Cas9 y los desafíos éticos y regulatorios que comporta. *Cuadernos de Bioética*, vol XXVII, num.2, mayo-agosto, pp. 223-239.
22. BOE-A-1999-20638 (20 d'octubre de 1999) núm. 251, páginas 36825 a 36830.
23. Lanphier, E., *et al.* Don't edit the human germ line. *Nature*, vol. 519, 2015, pp. 410-411.
24. Berg, P., *et al.*, (2015). “A prudent path forward for genomic engineering and germ line gene modification”. *Science*, vol. 348, n.6230, p. 38.
25. China condena a tres años de cárcel al polémico científico que realizó la primera modificación genética de bebés (30 diciembre 2019). BBC News Mundo. Recuperat de <https://www.bbc.com/mundo/noticias-50948086>
26. Decret 51/2018 (27 d'abril 2018). Diari oficial de la Generalitat Valenciana.
27. Decret 108/2014 (4 de juliol 2014). Diari oficial de la Generalitat Valenciana.
28. <https://www.youtube.com/watch?v=DUaI4U0XhkY>
29. Hsu, P. D., Lande, E. S. & Zhang, F. (2014). Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell* 157: 1262-1278.
30. Yang, G., & Huang, X. (2019). Methods and applications of CRISPR/Cas system for genome editing in stem cells. *Cell Regeneration* 8: 33-41.

31. Gersbach, C. A., *et al.* (2013). RNA-guided gene activation by CRISPRCas9–based transcription factors. *Nature methods*. Vol.10 N.10: 973-978.
32. Novoa, A., Lozovska, A., *et al.* (2019). CRISPR/Cas9-mediated methods for targeting complex insertions, deletions, or replacements in mouse. *MethodsX* 6, 2088–2100
33. BURKE, Brian, *Innovation Insight: Gamification Adds Fun and Innovation to Inspire Engagement*, Gartner, 2011.
34. Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346(6213): 1258096-1–9.
35. Biswal, A. K., *et al.* (2019). CRISPR mediated genome engineering to develop climate smart rice. Challenges and opportunities. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 96; 100-106.
36. Fiaz, S. (2019) Applications of the CRISPR/Cas9 system for rice grain quality improvement: Perspectives and opportunities. *International Journal of Molecular Sciences*. doi: 10.3390/ijms20040888.
37. Xu, R., Wei, P. *et al.* (2017). Use of CRISPR/Cas genome editing technology for targeted mutagenesis in rice. *Methods in Molecular Biology*, vol. 1498: doi 10.1007/978-1-4939-6472-7_3.
38. Nguyen, T.M., Zhang, Y. & Pandolfi, P.P. (2020). Virus against virus: a potential treatment for 2019-nCov (SARS-CoV-2) and other RNA viruses. *Cell Res* 30, 189–190.
39. Abbot T.R., *et al.* (2020). Development of CRISPR as a prophylactic strategy to combat novel coronavirus and influenza. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.13.991307>.
40. Pallito, N. & Folguera, G. (2020). An unsurprising alarm: CRISPR/Cas9 and the genetic editing of the human germline. *Science Direct and Bioethics update*, Vol 64.
41. Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J. & Almendros, C. (2009). Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology society*, Vol. 155, Issue 3.
42. Char, A. N., Li, R. & Yang, B. (2019). CRISPR/CAS9 for Mutagenesis in Rice. *Transgenic Plants: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 1864: doi https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8778-8_19.

43. Fiaz, S., Ahmad, S., Noor, M. A. et al. (2019). Applications of the CRISPR/Cas9 system for rice grain quality improvement: Perspectives and Opportunities. *International journal of Molecular Sciences*, 20, 888: doi 10.3390/ijms20040888.
44. Ortiz, J. P. A., Leblanc, O., Rohr, C., Pessino, S. C., et al. (2019). Small RNA-seq reveals novel regulatory components for apomixis in *Paspalum notatum*. *BMC Genomics*, 20:487: doi <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5881-0>.
45. Khanday, I., Skinner, D., Yang, B., Mercier, R. & Sundaresan, V. (2019). A male-expressed rice embryogenic trigger redirected for asexual propagation through seeds. *Nature*, vol. 365, 91-110.
46. Huang, J., Li, Z., & Zhao, D. (2016). Deregulation of the OsmiR160 target gene OsARF18 causes growth and developmental defects with an alteration of auxin signalling in rice. *Scientific reports*, 6:2992B: doi 0.1038/srep29938.
47. Xu, R., Wei, P. & Yang, J. (2017). Use of CRISPR/Cas genome editing technology for targeted mutagenesis in rice. *In vitro Mutagenesis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 1498: doi 10.1007/978-1-4939-6472-7_3.
48. Xie, K., Minkenberg, B. & Yang, Y. (2015). Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. *PNAS*, vol 112, no.11, 3570-3575.
49. Nishimura, A., Aichi, I. & Matsuoka, M. (2006). A protocol for Agrobacterium-mediated transformation in rice.
50. Mojica, F. J. M. & Montoliu, L. (2016). On the Origin of CRISPR-Cas9 technology: From prokaryotes to mammals. *Trends in Microbiology*, Vol. 24, No. 10.