



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Tjaša LAH

**ŽLAHTNENJE RASTLIN Z METODAMI
GENSKEGA INŽENIRINGA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Tjaša LAH

**ŽLAHTNENJE RASTLIN Z METODAMI GENSKEGA
INŽENIRINGA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja

PLANT BREEDING WITH GENETIC ENGINEERING METHODS

B. SC. THESIS

Academic Study Programmes

Ljubljana, 2018

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija – 1. stopnja Biotehnologija.

Študijska komisija 1. in 2. stopnje Študija biotehnologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Zlato Luthar.

Komisija za oceno in predstavitev:

Predsednica: prof. dr. Mojca NARAT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zoologijo

Članica: prof. dr. Zlata LUTHAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Polona JAMNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum predavitve: 7.9.2018

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du1
- DK UDK 606:631.528(043.2)
- KG žlahtnjenje rastlin, genski inženiring, *Agrobacterium tumefaciens*, ZFN, TALEN, CRISPR-Cas
- AV LAH, Tjaša
- SA LUTHAR, Zlata (mentorica)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Univerzitetni študijski program prve stopnje Biotehnologija
- LI 2018
- IN ŽLAHTNJENJE RASTLIN Z METODAMI GENSKEGA INŽENIRINGA
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij - 1. stopnja)
- OP VIII, 21 str., 1 pregl., 1 sl., 35 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Eno izmed najpomembnejših orodij molekularnega žlahtnjenja rastlin je genski inženiring, ki vedno bolj pridobiva na pomenu, saj omogoča nastanek rastlin z dobrimi agronomskimi lastnostmi, kot so zadovoljivi pridelki z vrhunsko kakovostjo, odpornostjo na bolezni in škodljivce ter fitosanitarne pripravke. Obstaja mnogo metod, ki se uporabljajo samostojno ali v kombinaciji z obstoječimi metodami žlahtnjenja. Med najbolj uporabljenimi metodami, ki omogočajo spremembo posamezne ali skupine lastnosti so biolistika, elektroporacija in mikroinjiciranje. Te metode je v veliki meri nasledila uporaba t. i. »naravnega genskega inženiringa« ki sloni na prenosu dednega materiala med bakterijo *Agrobacterium tumefaciens* in dvokaličnicami. Ta metoda je bila v več kot 65 % primerov uporabljena za požlahtnitev agronomsko pomembnih rastlin, ki se tržno pridelujejo. V zadnjih letih pa smo priča razvoju novejših metod za spreminjanje rastlinskega genoma, kot so ZFN – nukleaze z motivi cinkovih prstov, TALEN – nukleaze TAL efektorjev, CRISPR/Cas9 – gruče enakomerno prekinjenih kratkih palindromnih ponovitev s povezanim proteinom Cas9 in ODM – mutageneze z oligonukleotidi. Uvrščene so med najnovejše metode žlahtnjenja rastlin, o katerih trenutno intenzivno razpravljajo različni regulatorni organi v povezavi s tem, ali produkte nastale s temi metodami pokriva obstoječa zakonodaja EU o gensko spremenjenih organizmih in ali jih lahko uvrstimo med obstoječe metode žlahtnjenja z mutagenezo.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Du1
- DC UDC 606:631.528(043.2)
- CX plant breeding, genetic engineering, *Agrobacterium tumefaciens*, ZFN, TALEN, CRISPR-Cas
- AU LAH, Tjaša
- AA LUTHAR, Zlata (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology
- PY 2018
- TI PLANT BREEDING WITH GENETIC ENGINEERING METHODS
- DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)
- NO VIII, 21 p., 1 tab., 1 fig., 35 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB One of the most important tools of molecular plant breeding is genetic engineering, that increasingly gains in its importance as it allows the emergence of plants with good agronomic properties, such as satisfactory crops with premium quality, resistance to diseases and pests and phytosanitary preparations. There are many methods that are either used independently or in combination with already existing breeding methods. Among the most used methods, which make it possible to change a particular single property or a groups of properties are biolistics, electroporation and microinjection. These methods were largely followed by the use of a »natural genetic engineering« based on the transfer of the heritable material between the bacterium *Agrobacterium tumefaciens* and dicotyledons. This method was used in more than 65 % of the plant breeding cases for the regeneration of agronomically important plants that are market cultivated. In the last years however we are witnessing the development of newer methods for genome editing of plants, such as ZFN – zinc finger nucleases, TALEN – transcriptional activator-like effector nucleases, CRISPR/Cas9 – clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR-associated nuclease and ODM – oligonucleotide-directed mutagenesis. They are categorized as the newer breeding methods that are currently being discussed intensively by various regulatory bodies in relation to whether products produced by these methods cover existing EU legislation on GMOs and whether they can be classified as already existing methods of plant breeding with mutagenesis.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VI
KAZALO SLIK	VI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VII
1 UVOD	1
2 GOSPODARSKO NAJPOMEMBNEJŠA METODA TRANSFORMACIJE RASTLIN Z BAKTERIJO <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	3
2.1 BAKTERIJA <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	3
2.1.1 Prilagoditve naravne <i>A. tumefaciens</i> za namene genskega inženiringa	3
2.1.1.1 Cis vektorski sistem	3
2.1.1.2 Trans oz. binarni vektorski sistem	4
2.2 POTEK TRANSFORMACIJE	4
2.2.1 Vrsta in število vgrajenih kopij DNA	5
2.2.2 Ekspresija transgena in virulentnih genov ter povečanje učinkovitosti transformacije	6
2.2.3 Transgene rastline brez markerjev	7
2.4 LOČEVANJE TRANSFORMIRANIH OD NETRANSFORMIRANIH CELIC IN USPEŠNOST TRANSFORMACIJE	7
3 APLIKACIJE TRANSGENIH RASTLIN Z <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	8
4 NOVEJŠE METODE GENSKEGA INŽENIRINGA	9
4.1 NUKLEAZE Z MOTIVI CINKOVH PRSTOV	10
4.2 NUKLEAZE TAL EFEKTORJEV	11
4.3 GRUČE ENAKOMERNO PREKINJENIH KRATKIH PALINDROMNIH PONOVIJEV S CRISPR POVEZANIM PROTEINOM 9	12
4.4 MUTAGENEZA RASTLIN Z UPORABO OLIGONUKLEOTIDOV	14
5 APLIKACIJE NOVIH TEHNIK GENSKEGA INŽENIRINGA V RASTLINSKI PRIDELAVI	14
6 REGULATIVA RASTLIN NASTALIH Z NOVEJŠIMI TEHNIKAMI GENSKEGA INŽENIRINGA	17
7 ZAKLJUČEK	18
8 VIRI	19
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	Str.
Preglednica 1: Primerjava tehnologij za tarčno spreminjanje genomov (prirejeno po Sanagala in sod., 2017).....	13

KAZALO SLIK

Slika 1: Princip delovanja GEEN tehnik (Osakabe in Osakabe, 2014).	10
--	----

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
T-DNA	prenosna DNA (angl. <i>transfer DNA</i>)
ZFN	nukleaze z motivi cinkovih prstov (angl. <i>zinc-finger nucleases</i>)
TALEN	nukleaze TAL efektorjev (angl. <i>transcriptional activator-like effector nucleases</i>)
CRISPR	gruče enakomerno prekinjenih kratkih palindromnih ponovitev (angl. <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>)
Cas9	CRISPR povezan protein 9 (angl. <i>CRISPR associated protein 9</i>)
ODM	oligonukleotidno usmerjena mutageneza (angl. <i>oligonucleotide-derived mutagenesis</i>)
kbp	kilo bazni par (1000 bp)
bp ali b	bazni par
DBS	dvovijačni prelom (angl. <i>double strand break</i>)
BAC (BIBAC)	bakterijski binarni BAC kromosom (angl. <i>bacterial artificial chromosome (binary BAC)</i>)
<i>Cat</i>	gen za sintezo kloramfenikol acetiltransferaze
<i>Hpt</i>	gen za sintezo higromicin fosfotransferaze
<i>Npt</i>	gen za sintezo neomicin fosfotransferaze
<i>Pat</i>	gen za sintezo fosfotricin fosfotransferaze
<i>xylA</i>	gen za sintezo ksilozne izomeraze
<i>manA</i>	gen za sintezo fosfomanozne izomeraze
<i>badh</i>	gen za sintezo betain aldehyd dehidrogenazo
<i>gus</i>	gen za sintezo betaglukuronidaze
<i>DsRed</i>	gen za sintezo rdeče fluorescentnega proteina
GEEN	spreminjanje genoma z uporabo nukleaz (angl. <i>genome editing with engineered nucleases</i>)
NHEJ	nehomologno združevanje koncev (angl. <i>non-homologous end joining</i>)
RVD	angl. <i>repeat variable residue</i>

Asn	asparagin
Ile	izolevcin
Gly	glicin
His	histidin
Asp	aspartična kislina
crRNA	nekodirajoča CRISPR RNA (angl. <i>CRISPR RNA</i>)
tracrRNA	mala transkodirana CRISPR RNA (angl. <i>trans-activating CRISPR RNA</i>)
sgRNA	vodilna RNA (angl. <i>single guide ribonucleic acid</i>)
PAM	angl. <i>protospacer adjacent motif</i>
nt	nukleotid
ILDV	nekodirajoči vektor (angl. <i>integrase-deficient lentiviral vector</i>)
AAV	adeno virus (angl. <i>adeno-associated virus</i>)
PEG	polietilen glikol
SNP	polimorfizem posameznih nukleotidov (angl. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
ERF	faktor odzivnosti na etilen (angl. <i>ethylene-responsive factor</i>)
CVYV	virus rumenenja žil kumare (angl. <i>cucumber vein yellowing virus</i>)
ZYMV	virus rumenega mozaika buče (angl. <i>zucchini yellow mosaic virus</i>)
PRSV-W	virus-W obročkaste pegavosti papaje (angl. <i>papaya ring spot mosaic virus-W</i>)
ALS	acetolaktat sintaza
MDH	malat dehidrogenaza
ANT	antocianin
BFP	modri fluorescentni protein (angl. <i>blue fluorescent protein</i>)
GSO	gensko spremenjen organizem (angl. <i>GMO genetically modified organism</i>)
NPBT	nove tehnike žlahtnjenja rastlin (angl. <i>new plant breeding techniques</i>)

1 UVOD

Začetki žlahtnjenja segajo že 10.000 let nazaj, ko so ljudje zbirali semena najboljših samoniklih rastlin, kar danes imenujemo pozitivna selekcija in jih načrtno sejali na polju. To je vodilo do domestifikacije številnih kmetijskih rastlin. Pred 150 leti, ko je Gregor Mendel odkril zakone genetike, se je občutno povečalo načrtno delo, obseg ter vzpon žlahtnjenja. Odkritju navzkrižnega križanja je sledilo križanje v sorodstvu za pridobitev homozigotnih linij za vzgojo hibridnih sort v 30. letih, metode tkivnih in celičnih kultur v 60. letih in rekombinantna tehnologija DNA z metodami genskega inženiringa v 80. letih prejšnjega stoletja. Načrtno (t. i. »pametno«) križanje se je začelo okrog leta 1990 z uporabo molekularnih markerjev, mapiranja genomov in sekvenciranja.

Orodja genskega inženiringa omogočajo manipulacijo celičnega genoma, kar ima za posledico spremenjen ekspresijski profil genov. Tehnike in metode genskega inženiringa lahko povzročijo ekspresijo rekombinantnih proteinov, tarčne mutacije, stabilno gensko utišanje genov (»knock-out«), insercijo daljših tujih DNA segmentov v gostiteljski genom ali pa spremenijo regulacijske mehanizme in ekspresijo genov. Genomske modifikacije so lahko prehodne, stabilne ali dedne in vključujejo mnogo vrst biomolekul, ki se v celice lahko vnesejo pasivno, večinoma pa zahtevajo določene tehnike, kot so: mikroinjiciranje, elektroporacija, vnos z nanodelci in z rekombinantnimi bakterijami ali virusi. V rastlinah so nekatere tehnike genskega inženiringa omejene oz. neuporabne zaradi celične stene, zato so potrebne metodološke modifikacije, ki so specifične za določene vrste in ne predstavljajo omejitve pri regeneraciji rastlin, kar je bistveno pri končnem uspehu (Cunningham in sod., 2018).

Neposredne metode za vnos genov je v veliki meri nasledila posredna metoda z bakterijo *Agrobacterium tumefaciens* (Gaj in sod., 2013; Harrison in sod., 2014), katere prednost je vnos manjšega in manj poškodovanega števila kopij genov, zaradi naravnega vnosa pa je tudi rastlinsko tkivo manj poškodovano (Bohanec, 2004). *A. tumefaciens* je talna bakterija, ki okužuje širok nabor dvokaličnic in tvori t. i. »crown gall« bolezen - nastanek rakavih tvorbo. Nastanek tumorja v rastlini je posledica stabilnega prenosa, vgradnje (integracije) in ekspresije bakterijskega dela DNA v okuženih rastlinah. Rekombinantna T-DNA bakterijskega plazmida z želenimi geni je sposobna transformacije rastlin, zato se bakterija uporablja kot orodje – vektorski sistem za rastlinske genske transformacije že od zgodnjih 80. let prejšnjega stoletja (Bevan, 1984). Rastlinska transformacija je proces, ki zajema izrez T-DNA iz plazmida, transport po bakterijski in rastlinski celici in vgraditev v rastlinski jedrni genom. Celoten proces transformacije T-DNA je urejen z aktivnostjo virulentnih *vir* genov, prisotnih na bakterijskem plazmidu in *chv* genov na bakterijskem kromosomu. Ti geni se izražajo v prisotnosti fenolnih komponent, ki jih izloča ranjena rastlina. Bakterija se pripne na rastlinsko celico in ob prisotnosti visokih koncentracij fenolnih snovi se cepijo robne sekvence na vsaki strani enovijačne T-DNA. T-veriga se nato obda s specifično beljakovino t.

i. transporterjem, opremljenim z jedrno lokalizacijsko sekvenco in se prenese ter vgradi (integrira) v rastlinski genom. Vgradnja poteče na naključnih mestih v genomu z nehomologno rekombinacijo (Cunningham in sod., 2018).

Razvoj novih orodij v biotehnologiji, ki so uporabna v žlahtnjenju rastlin je doživelo v zadnjem obdobju ogromen razcvet. Obstoječi genski inženiring ima kar nekaj omejitev, kot je na primer otežena manipulacija z velikim rastlinskim genomom in vzpostavljena regulativa na področju gensko spremenjenih rastlin (Kamburova in sod., 2017). Spreminjanje genoma z nukleazami, ki so uvrščene v novejšo in natančnejšo metode genskega inženiringa, se geni dodajajo ali spreminjajo s pomočjo vrste encimov, ki so sposobni dvovijačnih prekinitev na specifičnih lokacijah v gostiteljskem genomu. Ko nastane prelom verige, celica vključi poti homologne rekombinacije ali nehomolognega združevanja koncev, da popravi prelom. Orodja za spreminjanje genomov so: ZFN – nukleaze z motivi cinkovih prstov, TALEN – nukleaze TAL efektorjev in CRISPR/Cas9 – gruče enakomerno porazdeljenih kratkih palindromnih ponovitev s povezanim proteinom Cas9. ZFN je leta 1990 postal prvi nukleazni sistem za selektivno spreminjanje genomov predvsem v bakterijah, TALEN in CRISPR pa sta bili razviti leta 2009 in 2012, predvsem za bakterije in evkarionte. Pri ZFN in TALEN gre za proteinske komplekse, ki imajo DNA vezavno in DNA cepitveno domeno in temeljita na reakciji protein - DNA. CRISPR/Cas sistem pa sestavljata nukleazni protein Cas9 in vodilna RNA, ki je homologna tarčni v genomu in temelji na formaciji ribonukleoproteinskega kompleksa. Čeprav imajo vsi sistemi nekaj omejitev, CRISPR/Cas predstavlja revolucijo na področju spreminjanja genomov, zaradi preprostosti, učinkovitosti in zmožnosti simultane spreminjanja različnih genov (Cunningham in sod., 2018).

Oligonukleotidno usmerjena mutageneza (ODM) ponuja hitro, natančno in ne transgeno alternativo za žlahtnjenje rastlin in izboljšanje lastnosti gospodarsko pomembnih rastlin. Z uporabo oligonukleotidov nastajajo tarčne modifikacije v plazmidih, episomalni in kromosomalni DNA v številnih organizmih, tudi rastlinah (Sauer in sod., 2015). ODM tehnika je znantno napredovala s pomočjo Cibus sistema za hitro razvrščanje (angl. *Cibus Rapid Trait Development System*) in se uspešno uporablja v številnih primerih izboljšanja pridelkov. Aplikacije vključujejo, vendar niso omejene samo na nastanek rastlin odpornih na herbicide in insekte ter bolezni (bakterijske, glivne in virusne), ampak na izboljšano hranilno vrednost in povešan pridelek brez vnosa tujih genov v primerjavi s tradicionalnimi pristopi genskega inženiringa (Kamburova in sod., 2017).

2 GOSPODARSKO NAJPOMEMBNEJŠA METODA TRANSFORMACIJE RASTLIN Z BAKTERIJO *Agrobacterium tumefaciens*

Ena od metod žlahtnjenja rastlin so genske transformacije, katerih prednost je pridobivanje požlahtnjenih rastlin v kratkem času in prenos genov med različnimi organizmi brez filogenetskih omejitev (Javornik, 2004). Biolistiko, elektroporacijo in mikroinjiciranje je v veliki meri nasledila posredna metoda za vnos genov z *Agrobacterium tumefaciens* (Gaj in sod., 2013; Harrison in sod., 2014). Prednost pred neposrednimi metodami je vnos manjšega in manj poškodovanega števila kopij genov, zaradi naravnega vnosa pa je tudi rastlinsko tkivo manj poškodovano (Bohanec, 2004). Posredna metoda vnosa transgenov z vektorskim sistemom *Agrobacterium tumefaciens* je na področju žlahtnjenja najuspešnejša metoda z največ gospodarsko zanimivimi spremembami genotipa in posledično fenotipa rastlin.

2.1 BAKTERIJA *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens in sorodne vrste ter sevi so znani talni rastlinski patogeni že od začetka 20. stoletja. V namene genskega inženiringa pa se uporabljajo zadnja tri desetletja (Gelvin, 2003). Ti sevi imajo velik megaplazmid (200-800 kb), ki igra pomembno vlogo pri nastanku tumorjev in se imenuje Ti plazmid. Med okužbo se mobilni segment Ti plazmida, T-DNA (10-30 kb) prenese v jedro rastlinske celice in vgradi v rastlinski kromosom (De la Riva in sod., 1998). Naravna T-DNA vsebuje 2 vrsti genov: *onco* gene, ki kodirajo encime, vključene v sintezo avksinov in citokinov, ki so odgovorni za nastanek tumorja ter gene za sintezo opinov. Te komponente, nastale s kondenzacijo aminokislin in sladkorjev uporabljajo bakterije kot vir ogljika in dušika. Zunaj T-DNA regije pa so locirani geni za katabolizem opinov in *vir* geni, vključeni v konjugativni proces prenosa T-DNA (Hooykas in Schilperoort, 1992; Zupan in Zambrysky, 1995).

2.1.1 Prilagoditve naravne *A. tumefaciens* za namene genskega inženiringa

Naravni sistem *A. tumefaciens* se danes uporablja pri žlahtnjenju rastlin za vnos pomembnih genov s pomočjo umetno pripravljenih Ti-plazmidnih vektorjev. Skupno vsem tem vektorjem je odsotnost genov za sintezo opinov in genov za tvorbo rakastih celic iz naravne T-DNA ter prisotnost robnih sekvenc T-DNA, kamor je mogoče vključiti tuje zelene gene (Zambryski in sod., 1983).

2.1.1.1 Cis vektorski sistem

Sestavljen je iz razoroženega Ti-plazmida (100 kb), kamor so vključeni tuji zeleni geni med robne sekvence T-DNA, na istem plazmidu pa se nahaja tudi vir regija, potrebna za izrez, transport in vgradnjo ter ori regija, potrebna za podvajanje plazmida. Robne sekvence T-DNA povečajo možnosti za vključitev v genom rastline in delujejo kot prepoznavna mesta za

endonukleazno cepitev. Zaradi odsotnosti *onc* genov in genov za sintezo opinov pa se transformirane celice lahko normalno diferencirajo (Luthar, 2017).

2.1.1.2 Trans oz. binarni vektorski sistem

Zaradi kompleksnosti vnosa tujih genov direktno v T-regije Ti-plazmidov so razvili alternativno kombinacijo dveh plazmidov znotraj bakterijske celice. Različni avtorji so namreč ugotovili, da se T-regija in *vir* geni lahko nahajajo ločeno na dveh plazmidih. Kadar so v isti celici, se produkti *vir* genov na T-regiji lahko obnašajo *trans* in vplivajo na procesiranje T-DNA in njen prenos v rastlinske celice (Gelvin, 2003). Binarni vektorski sistem je sestavljen iz binarnega plazmida (25 kb), kamor so med robne sekvence T-DNA vstavljeni želeni geni in razoroženega Ti-plazmida (100 kb), ki se nahaja v *A. tumefaciens* in vsebuje *vir* gene za okužbo rastlinskih celic. Prednost sistema je, da se lahko replicira tako v *E. coli* kot tudi v *A. tumefaciens* (Luthar, 2017). Ti plazmidi so majhni in enostavnejši za manipulacijo. Vsebujejo multipla restriksijska endonukleazna mesta znotraj T-regije, v katero se lahko klonira želeni gen. Razvitih je bilo nekaj sevov *A. tumefaciens* s pomnoženimi plazmidi, ki vsebujejo *vir* in *neonco* gene: LBA4404, GV3101 MP90, AGLO, EHA101 in njegov pomožni sev EHA105 ter NT1 (pKPSF2) (Gelvin, 2003).

2.2 POTEK TRANSFORMACIJE

Transformacija z *A. tumefaciens* je zelo kompleksna metoda in vključuje genetske zapise bakterije in rastline. Genske komponente bakterije vključujejo T-DNA, ki se prenese v rastlinske celice, virulentno regijo z *vir* geni na Ti-plazmidnem vektorju (30-40 kb), ki je glavno stikalo za transformacijo in kromosomske virulentne lokuse s *chv* geni, ekspresija katerih je konstitutivna v primerjavi s plazmidno virulentno regijo (Ziemienowicz, 2013). Kromosomski geni *pscA/exoC*, *chvA* in *chvB* imajo pomembne funkcije kot so produkcija, modifikacija in sekrecija eksopolisaharidov: β -1,2-glukana, cikličnega glukana in sukcinoglukana. Lokusi *att* imajo pomembno vlogo pri pritrjevanju bakterij na rastlinske celice. Geni *chvE* kodirajo sladkorne transporterje, vključene v koindukcijo *vir* genov, medtem ko so geni *chvD* vključeni v regulacijo indukcije *vir* genov, *acvB* geni pa so odgovorni za transport T-DNA (Gelvin, 2003).

T-DNA regija je obdana z visoko homolognimi mejnimi sekvencami (25 bp) v direktno ponovljivi orientaciji, med katere se lahko vstavijo želeni geni. Vir regija vsebuje 35 genov, reguliranih z 8 operoni: *virA*, *virB*,..., *virG* in *virH*, ki kodirajo proteine, vključene v procesiranje in prenos T-DNA (Ziemienowicz, 2013). *virA* in *virG* sta konstitutivna operona, ki kodirata dvokomponentni VirA-VirG sistem, ki kasneje aktivira še ostale *vir* gene (Nixon in sod., 1986; Iuchi, 1993). VirA je transmembranski dimerni senzorski protein, ki zaznava signalne molekule, ki se sproščajo iz ranjenih rastlin (hidroksiacetosiringon in acetosiringon). Aktivirani protein VirA ima sposobnost prenosa fosfata k aspartatnemu ostanku

citoplazemskega DNA vezavnega proteina VirG (De la Riva in sod., 1998). Po njegovi fosforilaciji le-ta sodeluje pri aktivaciji in povišanju nivoja transkripcije *vir* genov, najverjetneje z interakcijo z *vir*-box sekvencami, ki aktivirajo komponento promotorjev *vir* genov (Gelvin, 2003). Bolj virulentni sevi imajo več kopij gena *virG*. Proteina VirD1 in VirD2 prepoznata in cepita mejne sekvence T-DNA, po odcepitvi pa se znotraj meja lahko sintetizira nova veriga (Luthar, 2017). 11 VirB proteinov, skupaj z VirD4 proteinom, sestavlja sekretijski sistem tipa IV za transfer T-DNA in ostalih Vir proteinov, vključno z VirE2 in VirF. VirD4 omogoča interakcijo procesiranega T-DNA/VirD2 kompleksa z VirB sekretijskim aparatom. VirB2, VirB5 in VirB7 proteini sestavljajo T-pilus, ki najverjetneje služi kot most, ki je sestavljen iz t. i. »cevi« za transfer T-DNA in Vir proteinov in »kljuke«, ki zajame rastlinsko celico in jo privede v bližino bakterije. VirD2 protein vodi T-verigo do in skozi eksportni aparat, vsebuje pa še jedrne lokalizacijske signalne sekvence, ki pomagajo usmerjati T-DNA v rastlinsko jedro. VirE2 je DNA vezavni protein, ki najverjetneje vpliva na zvijanje DNA, kar olajša njen prenos skozi jedro poro in jo zaščiti pred nukleolitično razgradnjo v citoplazmi in jedru (Gelvin, 2003). T-DNA, skupaj z različnimi Vir proteini se prenese v gostiteljsko celico, kjer se regija T-DNA, ki nosi transgen integrira v rastlinski genom z uporabo enega izmed naslednjih mehanizmov: (i) integracija enovijačne DNA, ki temelji na mikrohomologiji ali (ii) integracija dvovijačne T-DNA na mesta dvovijačnih prekinitev (DBS, angl. *double strand breaks*) (Ziemienowicz, 2013). Rekombinacija je pogostejša v območjih, kjer se rastlinska DNA prepisuje, stabilno pa se lahko vgradi ena ali več kopij T-DNA (Luthar, 2017). Rastlinski proteini, kot so BTI1, VIP1, Ku80, CAK2Ms, histoni H2A, H3-11, H4 in SGA1, UDP glukoziltransferaza ter GALLS proteini naj bi bili vključeni v transfer T-DNA in transfer Vir proteinov, prehod skozi citoplazmo, jedro lokalizacijo, T-DNA integracijo, stabilnost in ekspresijo ter obrambne odgovore (Ziemienowicz, 2013).

2.2.1 Vrsta in število vgrajenih kopij DNA

T-regije naravnih Ti- ali Ri-plazmidov so dovolj velike, da lahko nosijo mnogo genov (npr. pTiC58 plazmid je velik 23 kb). Nekateri plazmidi lahko vsebujejo multiple T-regije, ki se prenesejo v rastline posamično ali v kombinaciji. Za namene genskega inženiringa si raziskovalci prizadevajo vnesti predvsem posamične kopije daljših T-DNA molekul, ki bi lahko kodirale multiple genske produkte v biosintetskih poteh. Z reverzno orientacijo desne mejne sekvence T-DNA se lahko prenese v rastline celoten Ti-plazmid, velikosti približno 200 kb. Z razvojem BAC (BIBAC) bakterijskega binarnega sistema so demonstrirali direktni prenos 150 kb dolgega kloniranega inserta humane DNA v rastline in uspešen transfer je zahteval povečano ekspresijo *virG* in *virE* genov. Ta sistem je bil uporabljen za transformacijo daljših DNA fragmentov (30-150 kb) v tobak, paradižnik in vrste *Brassica*. Razvili oz. sintetizirali so tudi umetni kromosomski vektorski sistem s P1 začetkom replikacije, ki ne zahteva povečane ekspresije *virG* ali *virE* genov za transformacijo repnjakovca (*Arabidopsis thaliana*) (Gelvin, 2003).

Raziskovalci so proučevali tudi vključevanje regij Ti-plazmida, ki se nahajajo izven klasičnih mejnih sekvenc T-DNA v rastlinsko DNA. Pri transformaciji tobaka so natančno preučili strukturo izven oz. ne T-DNA (»backbone«) sekvenc binarnih vektorjev, ki so jih našli v kar 75 % vseh transgenih rastlin in zaključili, da je tak prenos odvisen od izpustitve leve mejne sekvence med procesiranjem T-DNA z binarnega vektorja ali iniciacije prenosa T-DNA z leve mejne sekvence. Glede na to, da se VirD2 protein kovalentno pripenja na 5' konec T-DNA verige, so zaključili, da gre za naravno posledico delovanja VirD2 in da je prenos ne T-DNA neizogiben rezultat transformacije. Selekcija transgenih rastlin, ki vsebujejo neželena DNA bi bila možna s vključitvijo selekcijskega gena v ne T-DNA vektorske sekvence. Tak pristop bi bil uporaben za pridobivanje transgenih rastlin z zelo definirano genetsko strukturo (Gelvin, 2003).

2.2.2 Ekspresija transgena in virulentnih genov ter povečanje učinkovitosti transformacije

Za ekspresijo transgenov se navadno uporabljajo usmerjevalni elementi, kot so 35S in 19S promotorji mozaičnega virusa cvetače (Bohanec, 2004) ali promotorji sintaz opinov, ki izražajo transgen relativno konstitutivno (Gelvin, 2003). V zadnjem obdobju, ko so poskusi genskega inženiringa postali natančnejši, so začeli uporabljati regulirane promotorje, ki izražajo gen v točno določenem razvojnem in okoljskem obdobju ter tkivno-specifično. Taki inducibilni sistemi so lahko regulirani z agensi, kot so tetraciklini, alkohol, temperaturni šok in steroidni hormoni, vendar pa so mnogi od njih še nepopolni in njihovi mehanizmi vpliva še ne dovolj proučeni.

Kadar ekspresija transgena nekaj ur ali dni po transformaciji ni zaželeno (vpliv na prerazporejanje rastlinske DNA), se uporabljajo metode za prehodno ekspresijo kot so: (i) uporaba neintegrirajočih T-DNA sistemov in (ii) transfer proteinov namesto DNA. Neintegrirajoči T-DNA sistemi vključujejo uporabo mutantnih sevov *Agrobacterium* in/ali rastlinskih celic, ki so sposobni prenosa T-DNA v jedro, vendar pa niso sposobni njene integracije. Z zamenjavo 4 ohranjenih aminokislin z 2 serinskima ostankoma v C-terminalni (ω) domeni VirD2 proteina so dobili mutantni protein, ki omogoča ekspresijo, vendar ne učinkovite integracije (Gelvin, 2003).

Lahko se pojavijo tudi težnje po povečanem izražanju *vir* genov v primerjavi z rastlinskimi ekstrakti, zato so določili *virA* in *virG* mutante, ki delujejo konstitutivno v odsotnosti fenolnih komponent. Taki spremenjeni proteini imajo mutacije, ki so pretvorile asparagin-54 v aspartično kislino (*virGN54D*) ali izolevcin-106 v levcin (*virGII106L*). Povečanje števila kopij ali zmanjšanje njune odvisnosti od fenolnih inducerjev bi lahko povečalo učinkovitost transformacije (Gelvin, 2003).

2.2.3 Transgene rastline brez markerjev

Zaradi bojazni, da bi se geni za odpornost na antibiotike razširili v naravi ali geni za herbicidno odpornost vnesli v divje sorodnike gojenih rastlin in plevelne vrste, so razvili različne metode za nastanek transgenih rastlin brez markerjev. Te rastline bi primarno selekcionirali za odpornost na antibiotike ali herbicide, kasneje pa selekcijski marker odstranili z metodami, kot so: (i) rekombinacijski *Cre-lox* ali Flp-Frt sistemi za odstranjevanje markerjev, (ii) sistemi, ki temeljijo na premikanju transpozonov (za popolno odstranitev selekcijskega markerja ali njegovo prestavitev na druga nevezana mesta) ali (iii) uporaba multiplih T-DNA, ki se vstavijo na nekodirajoča mesta v genomu in lahko kasneje segregirajo (Gelvin, 2003).

2.4 LOČEVANJE TRANSFORMIRANIH OD NETRANSFORMIRANIH CELIC IN USPEŠNOST TRANSFORMACIJE

Med transformacijo rastlinskih tkiv ali celic se transformira le manjše število celic, zato je potrebna uporaba selekcijskih genov, ki omogočajo razvojno prednost celicam na gojišču s selekcijskim agansom, na katerem netransformirane celice ne uspevajo. Gre predvsem za odpornostne gene na določene antibiotike in herbicide. Selekcijski geni so na primer *cat* gen, ki kodira kloramfenikol acetiltransferazo (odpornost na antibiotik kloramfenikol), *hpt* gen, ki kodira higromicin fosfotransferazo (odpornost na antibiotik higromicin) in najpogosteje uporabljen *npt* gen, ki kodira encim neomicin fosfotransferazo, ki fosforilira in inaktivira antibiotik kanamicin (Luthar, 2018). Herbicidni geni, ki se uporabljajo pa so *bar* oz. *pat* gen, ki kodira fosfinotricin fosfotransferazo (odpornost na herbicid fosfinotricin) ter *epsps*, *aroAcp4* ali *gox* geni. Zaradi nevarnosti nastanka rezistentnih bakterij na selekcijske antibiotike se uporabljajo sodobnejši selekcijski geni, kot so *xylA*, ki kodira ksilozno izomerazo (D-ksilozna kot selekcijski agens), *manA*, ki kodira fosfomanozno izomerazo (6-fosfat kot selekcijski agens) ali gen *badh*, ki kodira betain aldehid dehidrogenazo v špinači (betain aldehid kot selekcijski agens). Za vizualno preverjanje vključitve tuje DNA v rastlinsko celico se uporabljajo markerski geni, kot so: najstarejši *gus* oz. *uidA* gen iz *E. coli*, ki kodira betaglukuronidazo (uničeno tkivo zaradi dodatka X-gluc substrata se obarva temno modro), poznamo pa še *gfp* gen, ki kodira zeleni fluorescentni protein, katerega fluorescenco lahko spremljamo v živem tkivu (Bohanec, 2004). V zadnjem obdobju se uporabljajo tudi drugi fluorescentni geni, pri rastlih je največ uporabljen *DsRed* gen, ki kodira rdeči fluorescentni protein (Luthar, 2017).

3 APLIKACIJE TRANSGENIH RASTLIN Z *Agrobacterium tumefaciens*

Metode transformacij z vektorskim sistemom z bakterijo *Agrobacterium* so bile sprva razvite na modelnih rastlinah: *Arabidopsis thaliana*, *Medicago trunculata*, *Nicotiana tobaccum* in *N. benthamiana*. Zadnjih nekaj let pa število predvsem gospodarsko vodilnih rastlinskih vrst, ki so bile požlahtnjene z genskim inženiringom močno narašča: žita, oljnice, predivnice, stročnice, zelenjadnice, sadne, okrasne in lesnate ter zdravilne in aromatične rastline.

Transformacija z *Agrobacterium* se uporablja za pridobivanje številnih uporabnih proteinov (rekombinantnih protiteles in cepiv). Z uporabo transgenega krompirja, ki izraža antigene vključno s toplotno labilnim enterotoksinom iz *E. coli*, kapsidnim proteinom virusa Norwalk, površinskim antigenom hepatitisa B in transgenim alfaalfa proteinom virusa, ki okužuje usta in stopala, je bila dosežena oralna imunizacija. S transformacijami so bile pridobljene tudi rastline, ki producirajo biofarmacevtike, kot so antikoagulantni, humani epidermalni rastni faktorji in interferoni (Ziemienowicz, 2013).

Transgene rastline lahko služijo tudi kot biomonitorji, ki zaznavajo prisotnost toksičnih komponent v okolju ter razstrupljajo tla in površinske vode. V repnjakovcu (*Arabidopsis thaliana*), indijski gorčici in tobaku so izboljšali toleranco na kovine s povečano ekspresijo encimov, ki negativno vplivajo na strukture fitokelatinov. Požlahtnjene so bile rastline repnjakovca, ki so sposobne pretvorbe metiliranega živega srebra v hlapen, manj toksičen produkt; rastline sposobne ekstrakcije in akumulacije arzena iz talnih voda s kombinacijo ekspresije encimov, vključenih v biosintezo glutationa in v metabolizem arzena; rastline indijske gorčice, ki procesirajo selenit (pogost kontaminant odpadnih voda naftnih rafinerij) ter rastline tobaka, ki omogočajo degradacijo eksplozivnega trinitrotoluena (Ziemienowicz, 2013).

Znan paradižnik »flavr savr« s podaljšano svežino oz. odpornostjo na upočasnjeno mehčanje je bil požlahtnjen s spremenjeno biosintezo potjo hormona etilena, ki je odgovoren za zorenje plodov in izboljšano vsebnostjo poliaminov ter supresijo encimov za procesiranje N-glikana. Transgeni tobak, ki je sposoben sinteze cianobakterijskega encima ima izboljšano fotosintetsko aktivnost, sočasno pa se mu je povečala tudi biomasa (Ziemienowicz, 2013).

Transformacija je uporabna tudi za nastanek rastlin z izboljšano toleranco na biotske in abiotske strese, za izboljšanje hranilne vrednosti, odpornosti na škodljivce, za povečanje pridelkov in zmanjšanje uporabe škodljivih agrokemikalij, povečana absorpcija fosforja lahko pa lahko zniža uporabo gnojil. Vnos genov za povečano biosintezo kelatorjev železa je izboljšalo rast in pridelke riža v okolju z nizko vsebnostjo železa v tleh. Poskusi tolerance na aluminij so vodili do nemotene rasti transgenega tobaka in papaje na onesnaženih tleh. Rastlinske vrste: koruzo, bombaž, čičeriko, paradižnik in riž z odpornostjo na insekte so požlahtnili z vnosom različnih toksičnih genov, vključno z Bt toksinom, ki insekticidno

delujejo na 300 vrst insektov iz skupin metuljev in večč, hroščev in drugih dvokrilcev in so neškodljivi za sesalce in druge neciljne organizme. Ektopična ekspresija sintetičnih antimikrobnih peptidov v transgenem repnjakovcu in krompirju pa je zagotovila odpornost na bakterijske in glivne patogene. Rastline s povišano produkcijo salicilne kisline so prav tako pokazale povišano odpornost na bolezni (Ziemienowicz, 2013).

Genetska modifikacija rastlin za prehrano ponuja možnosti za izboljšanje prehranske vrednosti. Transformacijo z *Agrobacterium* so uporabili za: (i) povečevanje vsebnosti beta-karotena v oljni ogrščici, soji in koruzi, (ii) vsebnosti vitamina A v rižu (razvoj t. i. »zlatega riža«, posledica pomanjkanja je keratomalacija - sušenje in odstopanje roženice in slepota) ali (iii) izboljšanje oljne vsebnosti. Oljno ogrščico in sojo so modificirali tako, da sta izražali višje ravni lizina, v krompir je bil vnesen gen za nealergeni protein albumin z dobro uravnoteženo aminokislinsko sestavo, manipulacija adenilatnih sestavin pa je zvišala vsebnost škroba v krompirju in pridelek. Biosintezo vitamina E so povečali v repnjakovcu, soji in koruzi; v paradižniku pa sintezo ostalih pomembnih antioksidantov (likopen, klorogenična kislina) s povečano ekspresijo ustreznih encimov (Ziemienowicz, 2013).

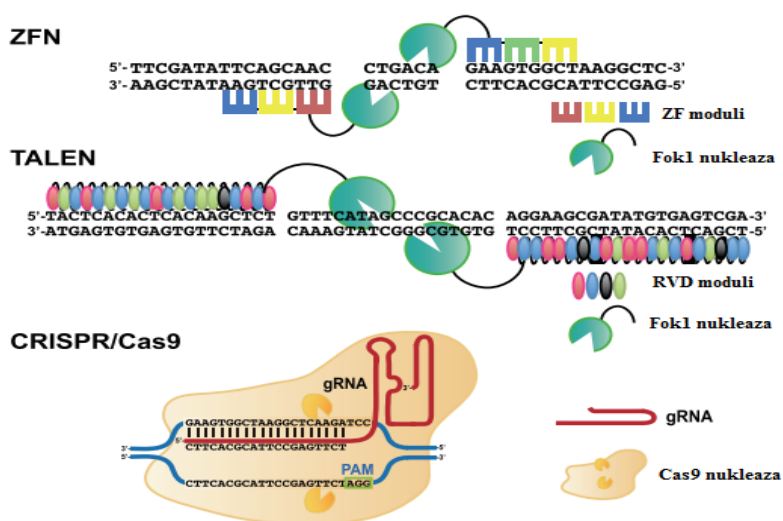
4 NOVEJŠE METODE GENSKEGA INŽENIRINGA

Z uporabo restriktivskih endonukleaz in ligaz je izjemno težko manipulirati velike in kompleksne genome višjih organizmov, saj restriktivske endonukleaze delujejo na relativno kratke DNA sekvence, zato taka specifičnost ni dovolj za manipulacijo velikih rastlinskih genomov (Kamburova in sod., 2017). Tarčno spreminjanje genoma z uporabo nukleaz, imenovano tudi GEEN (angl. *genome editing with engineered nucleases*) je učinkovita metoda genskega inženiringa, ki uporablja posebna orodja za ciljno delo in cepitev DNA na specifičnih mestih v genomu (Osakabe in Osakabe, 2014) (slika 1). Himerne nukleaze vsebujejo eno ali dve strukturni enoti, izmed katerih ena katalizira cepitev DNA, druga pa je sposobna selektivne vezave na specifično nukleotidno zaporedje tarčne molekule (Kamburova in sod., 2017). Vodene nukleaze najdejo specifično zaporedje in cepijo dvojno vijačnico, s čimer povzročijo prelom verige (DSB, angl. *double strand break*), spremembe v genomu pa nastanejo zaradi celičnih popravljalnih mehanizmov (Gaj in sod., 2013; Harrison in sod., 2014), kot sta NHEJ (angl. *non-homologous end joining*) in homologna rekombinacija. NHEJ je najpreprostejši mehanizem, kjer se konci prerezane DNA združijo, to pa lahko povzroči delecijo ali insercijo nukleotidov (Kamburova in sod., 2017). Če se nenatančno popravljanje pojavi v kodirajočih sekvencah, se pojavijo mutacije, ki vplivajo na spremembo bralnega okvirja in povzročijo gensko utišanje (»knock-out«). Lahko se pojavijo tudi drugi tipi mutacij, na primer tiste, ki odstranijo nekaj aminokislin v kodirajoči sekvenci brez spremembe bralnega okvirja. Insercije/delecije v promotorjih pa lahko zmotijo ključne regulatorne sekvence in vplivajo na ekspresijo genov (Songstad in sod., 2017). Pri homologni rekombinaciji pa se za popravljanje DNA prelomov uporablja sekvenca, ki je homologna tarčni sekvenci in omogoča insercijo ali zamenjavo želenih genov (»knock-in« mutacije)

(Malzahn in sod., 2017). Homologna rekombinacija je omejena na pozno S/G2 fazo celičnega cikla, medtem ko NHEJ deluje skozi celoten celični cikel, zato je glavni popravljalni mehanizem v evkariontih (Sonoda in sod., 2006).

Za razliko od »knock-out« mutacij, ki navadno povzročijo izgubo funkcije, »knock-in« mutacije povzročajo pridobitev ali modifikacijo funkcije z dodajanjem in zamenjavo genetskega materiala. Transformacija rastlin z neposrednim vnosom DNA ali posrednim preko bakterijskega vektorskega sistema *A. tumefaciens*, navadno zajema naključno DNA integracijo. »Knock-in« mutacije z uporabo nukleaz omogočajo višji nivo natančnosti in tarčna DNA integracija omogoča večji nadzor nad genetskim okoljem, ki obdaja integrirano DNA in biološkimi posledicami takih genetskih modifikacij (Songstad in sod., 2017).

Dvovijačne prelome lahko povzročijo 4 sistemi, ki temeljijo na specifičnih encimih: (i) velike nukleaze, (ii) nukleaze z motivi cinkovih prstov - ZFN, (iii) nukleaze TAL efektorjev – TALEN in (iv) CRISPR nukleaze. V primerjavi z velikimi nukleazami ostali sistemi omogočajo učinkovitejšo modifikacijo ciljnih zaporedij za različne namene (Osakabe in Osakabe, 2014).



Slika 1: Princip delovanja GEEN tehnik (Osakabe in Osakabe, 2014).

4.1 NUKLEAZE Z MOTIVI CINKOVIIH PRSTOV

Nukleaze z motivi cinkovih prstov so bile prva generacija orodij za tarčno spreminjanje genomov, ki izkoriščajo himerne modificirane nukleaze, ki so jih razvili po odkritju Cys2-His2 domene cinkovega prsta, ki je sestavljena iz 30 aminokislinskih ostankov, zvitih v $\beta\beta\alpha$ konfiguracijo. Kristalna strukturna analiza je pokazala, da Cys2-His2 proteini cinkovih prstov vežejo DNA tako, da vstavijo α -heliks v veliki žleb dvovijačne DNA (Pavletich in Pabo, 1991). Aminokisliline na položajih -1, +2, +3 in +6 glede na začetek α -heliksa se lahko spremenijo in prilagodijo tako, da ustrezajo specifičnim ciljnim zaporedjem (Osakabe in

Osakabe, 2014). Monomer nukleaze cinkovega prsta je sestavljen iz dveh različnih funkcionalnih domen: umetne Cys2-His2 domene na N-terminalni regiji in nespecifične FokI DNA cepitvene domene na C-terminalni regiji. FokI je restriksijski encim, najden v bakteriji *Flavobacterium okeanokoites*, ki je sestavljen iz ločljive DNA vezavne domene in nukleazne domene, ki se uporablja za nastanek ZFN in TALEN. Ključna za encimatsko aktivnost je dimerizacija FokI domene (Kim in sod., 1996). Ugotovitev, da modularno prepoznavanje tarčne sekvence z ZF domeno temelji na prepoznavanju 3 ustreznih zaporednih baznih parov omogoča, da se vsaka od individualnih ZF domen lahko zamenja. Manipulacija zaporedja domen pa vodi do posebnih vezavnih značilnosti. Na primer: dimer, sestavljen iz 3 ali 4 ZF domen, prepozna tarčno sekvenco 18-24 baznih parov, kar statistično predstavlja posebna mesta v genomu večine organizmov. Od prve uporabe ZFN leta 1996 so tehniko uporabili v številnih organizmih. V rastlinah so inaktivirali tarčne gene v repnjakovcu, modificirali gene v tobaku z visoko ponovljivostjo in vnesli gene za odpornost na herbicide v koruzo (Kamburova in sod., 2017).

4.2 NUKLEAZE TAL EFEKTORJEV

Iskanje učinkovite in selektivne manipulacije tarčne genomske DNA je vodilo do odkritja posebnih transkripcijskih efektorskih proteinov (TALE), ki prepoznajo in aktivirajo specifične rastlinske promotorje s setom tandemskih ponovitev (Jankele in Svoboda, 2014). TALE proteini izhajajo iz različnih rastlinskih bakterijskih patogenov, rodu *Xanthomonas*. Ti patogeni izločajo TAL efektorje v celice gostiteljske rastline s sekrecijskim sistemom tipa III med okužbo, nato se ti proteini premaknejo do jedra, kjer prepoznavajo in se vežejo na specifično DNA zaporedje v promotorski regiji določenega gena in aktivirajo transkripcijo (Boch in Bonas, 2010). Sestavljeni so iz centralne domene, odgovorne za vezavo DNA, jedrnih lokalizacijskih signalov in domene, ki je odgovorna za aktivacijo transkripcije tarčnega gena. Centralno DNA vezavno domeno sestavlja 13-28 ponovitev, dolgih 33-35 aminokislin. Aminokislina vsake ponovitve je visoko ohranjena, razen hipervariabilnih aminokislinskih ostankov na položajih 12 in 13 (RVD, angl. *repeat variable residues*), ki imata vlogo pri bazno specifičnem kontaktu z DNA. Monomeri z RVD Asn in Ile (NI), Asn in Gly (NG), dvema Asn (NN) ter His in Asp (HD) se vežejo z nukleotidi A, T, G in C, NN pa se lahko veže tudi z A. Prvi aminokislinski ostanek v RVD (N ali H) je odgovoren za stabilizacijo prostorske konfiguracije, drugi ostanek pa se direktno veže z nukleotidom preko vodikovih vezi ali van der Waalsovih sil (Kamburova in sod., 2017).

Vsaka ponovitev veže en nukleotid v tarčni nukleotidni sekvenci. Zadnje tandemsko zaporedje, ki se veže na nukleotid na 3'-koncu tarčnega mesta pa je sestavljeno samo iz 20 aminokislin, zato se imenuje polovična-ponovitev (Osakabe in Osakabe, 2014). Dokler določena DNA vsebuje prepoznavno sekvenco za vezavo TALE domene, lahko dvovijačni prelomi nastanejo kjerkoli v genomu, vendar pa mora biti na 5' koncu tarčne sekvence prisoten timidin, ker je bilo dokazano, da se nanj veže W232 ostanek na N-terminalnem delu

DNA vezavne domene (Lamb in sod., 2013). Po odkritju prepoznavnega koda TALE proteinov so začeli s pridobivanjem himernih TALEN. V ta namen je bila DNA vezavna TALE domena vstavljena v plazmidni vektor, prej uporabljen za kreiranje ZFN, kar je rezultiralo z nastankom sintetičnega genetskega konstrukta, ki je vseboval DNA vezavno domeno TALE proteina in katalitično domeno FokI restrikcijske endonukleaze. Podobno kot ZFN, TALEN dimerizira, ko dva monomera prepoznata individualno DNA tarčno mesto. Ta konstrukt je pripomogel k nastanku umetne nukleaze z DNA vezavno domeno in različnimi RVD, ki lahko prepoznajo katerokoli željeno sekvenco (Nemudryi in sod., 2014; Gaj in sod., 2013).

Zaradi relativno nizke toksičnosti TALEN v primerjavi z ZFN, se pri ekspresiji TALEN lahko uporabljajo tako močni konstitutivni promotorji, kot tudi dodatni inducibilni promotorji, ki so uporabljeni pri ekspresiji ZFN, vendar so ugotovili, da je uporaba prvih bolj učinkovita za tarčno mutagenozo s TALEN (Osakabe in Osakabe, 2014).

4.3 GRUČE ENAKOMERNO PREKINJENIH KRATKIH PALINDROMNIH PONOVIČEV S CRISPR POVEZANIM PROTEINOM 9

Metoda uporablja adaptivni imunski sistem bakterij in arhej za zaščito pred vdori tuje DNA - mehanizem, ki je odvisen od prisotnosti posebnih mest v bakterijskem genomu. Gre za CRISPR lokuse, ki so sestavljeni iz operonov, ki kodirajo Cas9 protein, ki cepi virusno DNA (Malzahn in sod., 2017) in kratkih ponovljivih nizov segmentov, ki prihajajo iz tuje DNA in se integrirajo v bakterijski genom po rekombinaciji (Kamburova in sod., 2017). Najbolj uveljavljen sistem je CRISPR/Cas tipa II-A, odkrit v bakteriji *Streptococcus pyogenes*, kjer CRISPR lokus vsebuje kombinacijo 3 genov, ki kodirajo protein Cas9, nekodirajoče RNA elemente, t. i. CRISPR RNA (*crRNA*) in male transkodirane CRISPR RNA (*tracRNA*). Slednja skupaj formirata kompleks vodilne RNA (sgRNA), ki vodi Cas9 nukleazo do tarče (Barrangou, 2012). Ko sgRNA najde PAM (angl. *protospacer adjacent motif*) sekvenco (5'-NGG-3') v tarčnem zaporedju, se nanjo veže in razpre preostalo DNA, da preveri njeno komplementarnost z 20 nukleotidov dolgo sgRNA. V genomih pa se lahko pojavijo tudi podobna zaporedja, kar povzroči razrez netarčne DNA. Sistem tolerira do 6 nukleotidnih neujemanj med zaporedjema. Najbolj pomembni za specifičnost so nukleotidi, ki so 8 do 12 mest pred PAM regijo (Harrison in sod., 2014).

Cas9 protein vsebuje 2 homologni nukleazni domeni RuvC in HNH. HNH nukleazna domena cepi komplementarno DNA verigo, medtem ko RuvC domena cepi nekomplementarno verigo. Za ekspresijo Cas9 se najpogosteje uporablja 35S promotor mozaičnega virusa cvetače, Cas9 pa se označi še z jedrnimi lokalizacijskimi signali, da se zagotovi njegov vnos v jedro. Za ekspresijo sgRNA v rastlinah se najpogosteje uporabljajo polimerazni III promotorji, kot na primer U6 in U3, ki imajo definiran začetni nukleotid, ki je G pri U6 ali A pri U3 (Belhaj in sod., 2013).

Preglednica 1: Primerjava tehnologij za tarčno spreminjanje genomov (prirejeno po Sanagala in sod., 2017).

Aktivnost	ZFN	TALEN	CRISPR
Prepoznavanje	Protein-DNA	Protein-DNA	RNA-DNA
Determinanta, ki prepozna DNA	Proteini cinkovih prstov	TAL efektorji	sgRNA
Nukleaza	Fok1	Fok1	Cas9
Tarčno zaporedje	≤ 2 x 12 nukleotidov	≤ 2 x 16 nukleotidov	Skoraj 20 nukleotidov
Konstrukt	Sekvenca cinkovega prsta povezana s Fok1, ki specifično prepozna 3 bp	Proteinska sekvenca povezana s Fok1, specifična za vezavo nukleotidne sekvence	crRNA (20 nt) + tracrRNA in Cas9 endonukleaza
Velikost konstrukta	(1 kb) 2	(3 kb) 2	4,2 kb (Cas9) + 0,1 kb (RNA)
Stroški in čas sestavljanja konstrukta	Zelo drago in časovno zamudno	Relativno drago in časovno zamudno	Nizki stroški in hitra priprava
Multipleksiranje	Ne	Ne	Možno
Stopnja uspešnosti	Nizka	Visoka	Visoka

Ena izmed izrazitih prednosti CRISPR/Cas9 pred ZFN in TALEN je zmožnost multipleksiranja (preglednica 1). Z ekspresijo multiplih sgRNA, ki se lahko neodvisno pariyo s Cas9, se lahko mutirajo multipla tarčna mesta, kar lahko vodi do več kot ene izboljšane lastnosti v rastlinah (Malzahn in sod., 2017).

Čeprav tehnike opisane zgoraj ohranjajo nativno genomsko strukturo, se vseeno pojavljajo pomisleki glede varnosti uporabe takih pridelkov. Ena izmed glavnih skrbi je možnost nastanka netačnih dogodkov. Za minimiziranje teh dogodkov je potrebna pozorna izbira mest za cepitev z uporabo obsežne bioinformatične analize. Med izbiranjem tarčnih mest za cepitev naj bi se izogibali predvsem mestom, ki imajo visoko homologijo z drugimi regijami in ponovljivih sekvenc (Kamburova in sod., 2017).

Čeprav nukleaze omogočajo različne modifikacije v genomu, so tehnike še vedno omejene z metodami za vnos teh encimov v celice. Navadno se geni, ki kodirajo nukleaze vnašajo v celice v obliki plazmidne DNA, s pomočjo vektorjev ali *in vitro* prepisano mRNA (Gaj, 2013). Pri večini rastlinskih vrst se DNA vnaša z uporabo *A. tumefaciens* ali biolističnih in elektroporacijskih metod v protoplaste in druge tkivne izsečke (Songstad in sod., 2017). Transfekcija plazmidne DNA ali mRNA z elektroporacijo ali kationskimi lipidnimi reagenti

je lahko toksična in je zato omejena le na določene celične strukture. Neintegrirajoči vektorji (ILDV, angl. *integrase-deficient lentiviral vectors*) so atraktivna alternativa za vnos ZFN, vendar pa metoda ni kompatibilna z visoko ponovljivimi TALEN sekvencami. Za vnos ZFN je primeren tudi AAV (angl. *adeno-associated virus*), vendar pa je učinkovitost odvisna od dolžine ekspresijskega konstrukta, ki ne sme biti daljši od 4,2 kb (kar je primerno za oba ZFN monomera in donorski konstrukt, vendar pa samo enega TALEN monomera z minimalno promotorsko sekvenco). Prečkanja celične membrane pa so sposobni tudi očiščeni ZFN proteini, kar lahko občutno zniža netarčne dogodke, saj so celice krajši čas izpostavljene nukleazam (Gaj, 2013).

4.4 MUTAGENEZA RASTLIN Z UPORABO OLIGONUKLEOTIDOV

Po prvi uspešni uporabi v sesalcih, je mutageneza z uporabo oligonukleotidov (ODM, angl. *oligonucleotide-directed mutagenesis*) postala še eno izmed novejših orodij za tarčno spreminjanje genomov v rastlinah. ODM uporablja 20-100 baz dolg oligonukleotid; sekvenco, ki je identična tarčni sekvenci v genomu s to razliko, da ima spremenjen le en bazni par, s katerim se nato doseže sprememba gena oz. želenega zaporedja. S pomočjo homolognega parjenja med oligonukleotidom in DNA tarčne sekvence, se celični popravljalni mehanizem, ki prepozna razliko enega baznega para usmeri na tarčna mesta in popravi neujemanja med zaporedjema (Sauer in sod., 2015), kar vodi do nastanka nove lastnosti (Kamburova in sod., 2017). Oligonukleotid se ne vključi v rastlinski genom, ker modifikacija na 3' in 5' koncu prepreči DNA ligacijo skupaj z aktivnostjo endogenih nukleaz in ostalih encimov za degradacijo oligonukleotidov (Songstad in sod., 2017).

Za vnos oligonukleotidov v rastline se najpogosteje uporabljata metodi polietilen glikol (PEG) in obstreljevanje (biolistika), vendar pa je težko primerjati frekvence pretvorb z različnimi metodami za vnos, saj so le-te odvisne od rastlinske vrste, celičnega biološkega sistema, tipa oligonukleotida, njegove koncentracije in tarčne verige (kodirajoče ali nekodirajoče) ter vrste tarčne mutacije, ki se vnaša (Sauer in sod., 2015).

5 APLIKACIJE NOVIH TEHNIK GENSKEGA INŽENIRINGA V RASTLINSKI PRIDELAVI

Novejše tehnike genskega inženiringa omogočajo številne aplikacije za hitro reševanje enega najpomembnejših izzivov moderne biotehnologije – ustvarjanje novih sort z visokimi pridelki, izboljšano hranilno vrednostjo ter odpornostjo na biotske in abiotske strese. Zato so se ti novi sistemi začeli uporabljati v žlahtnjenju rastlin za: (i) vstavljanje točkovnih mutacij, podobnih SNP (angl. *single nucleotide polymorphism*), (ii) nastanek majhnih modifikacij v funkciji genov, (iii) integracijo tujih genov, (iv) piramidenje genov in gensko utišanje (»knock-out«), (v) represijo ali aktivacijo genske ekspresije in (vi) epigenetsko tarčno spreminjanje (Kamburova in sod., 2017).

Rastline sintetizirajo mnogo snovi, produktov, ki negativno vplivajo na kvaliteto hrane, hrambo in predelavo, zato jih lahko genski »knock-out« izloči ali vpliva na akumulacijo koristnih metabolitov (Songstad in sod., 2017). Clasen in sod. (2015) poročajo o tetraploidnem krompirju, kjer so izvedli »knock-out« 4 kopij gena. Krompir po pobiranju hranijo v hladnih prostorih, da bi podaljšali njegovo obstojnost, vendar pa se v tem času škrob razkrajja, kar je opazno pri cvretju, kjer se sladkorji na visokih temperaturah pretvarjajo v rjavo barvo in se začne tvoriti strupeni akrilamid. Zato so pripravili TALEN konstrukte, ki ciljajo gene za vaskularno invertazo (encim, ki sladkorne komponente pretvarja v glukozo in fruktozo). TALEN metodo pa so uporabili tudi za upočasnitev aktivnosti dveh maščobno kislinskih desaturaznih genov v soji (*FAD2*, *FAD3*), ki sta odgovorna za pretvorbo mononasičene oleinske kisline v polinenasičeno linoleinsko kislino. Pridobili so semena soje z visoko vsebnostjo oleinske kisline (normalna vsebnost 20 %, zvišana na 80 %) in znižano vsebnostjo polinenasičenih maščobnih kislin, vključno z linoleinsko (normalna vrednost 50 %, znižana na 4 %) (Haun in sod., 2014).

Glavna aplikacija pa je pridobivanje sort, odpornih na različne patogene in škodljivce. Tehnike se uporabljajo za modifikacijo: (i) občutljivostnih genov (S-geni), (ii) odpornostnih genov (R-geni), (iii) genov, ki regulirajo interakcijo med efektorjem in tarčo ter (iv) genov, ki regulirajo rastlinsko hormonsko ravnotežje (Kamburova in sod., 2017). V heksaploidni pšenici so izvedli »knock-out« 6 alelov *Mlo* gena s tehnikama TALEN in CRISPR/Cas9. S tem so pridobili rastline, odporne na prašno plesen (angl. *powdery mildew*) (Songstad in sod., 2017). Gre za eno od hudih boleznih, ki jo povzroča gliva *Blumeria graminis f.sp.tritici* z delovanjem na lokus O (MLO), ki kodira G-protein, da se spremeni funkcionalnost obrambnega mehanizma v rastlinah. V primeru mutirane sorte pšenice je penetracija plesni v celično steno ovirana (Shah in sod., 2018). Pri rižu so pridobili rastline odporne na bakterijski patogen *Xanthomonas oryzae* (Songstad in sod., 2017). Med okužbo *Xanthomonas* izloča efektorske TAL proteine v celice riža, ki se vežejo na promotorsko regijo gena *OsSWEET14* za sintezo saharoze, kar aktivira njegovo ekspresijo in preživetje ter virulenco patogena. Majhna sprememba na specifičnih mestih za vezavo TAL efektorjev s TALEN metodo v teh genih je vodila do rastlin, ki so bile odporne na bakterijski patogen, ker TAL efektor ni mogel več prepoznati tarčnega mesta (Shah in sod., 2018). Z omenjenimi metodami se modificirajo tudi metabolne poti, ki regulirajo hormonsko ravnotežje v rastlinah in tako se poviša nivo imunomodulatornih komponent rastlinskega imunskega sistema. To se lahko doseže z deaktivacijo ERF (angl. *ethylene-responsive factor*). Etilen odvisna pot je bila uspešno modificirana v rižu s CRISPR/Cas9 odvisno tarčno gensko mutacijo *OsERF922*, kar je privedlo do rastlin, odpornih na *Magnaporthe oryzae*. CRISPR/Cas9 so uporabili za utišanje (»knock-out«) gena *eIF4E*, ki kodira translacijski iniciacijski faktor v evkariontih, nujen za translacijo virusov v *Cucumis sativus*. Utišanje (»knock-out«) je zagotovilo odpornost na viruse, kot so CVYV virus rumenenja žil kumare (angl. *cucumber vein yellowing virus*), ZYMV virus rumenega mozaika buče (angl. *zucchini yellow mosaic virus*) in PRSV-W virus-

W obročkaste pegavosti papaje (angl. *papaya ring spot mosaic virus-W*) (Kamburova in sod., 2017).

Obstoječe metode za tarčno spreminjanje genomov, predvsem CRISPR/Cas9 imajo pomembne aplikacije tudi pri pridobivanju rastlin, odpornih na herbicide. Tarčno spreminjanje gena *ALS2* v koruzi (acetolaktat sintaza ali ALS je ključni encim v biosintezi aminokislin v rastlinah in je inhibiran s herbicidom sulfonilureo) je omogočilo ustvarjanje mutantnih rastlin koruze, odpornih na klorsulforon. Tudi uporaba ZFN v repnjakovcu in koruzi je vodila do uspešnega razvoja genotipov, odpornih na herbicide z insercijo genov za herbicidno odpornost. ZFN so prav tako uporabili za tarčne modifikacije endogenih malat dehidrogenaznih genov (MDH) in rastline, ki so vsebovale modificirane MDH gene so imele višje pridelke.

S tarčno mutagenozo gena *SP5G* v paradižniku so pridobili rastline s predčasnim cvetenjem in kompaktnjšo obliko rasti, kar vpliva na hitrejše zorenje in pobiranje plodov. Z uporabo CRISPR inducirane mutageneze 2 genov *OST* v repnjakovcu so pridobili nove alele, ki omogočajo odpornost rastlin na visoke koncentracije soli. Modulacija biosinteze giberelina je omogočila nastanek pritlikavih sadnih dreves, ki imajo velik potencial, saj se take rastline v nasadih lahko posadijo gosteje, kar vpliva na zmanjšano uporabo površine, vode, pesticidov in gnojil (Kamburova in sod., 2017).

Malzahn in sod. (2017) poročajo, da je tarčna insercija močnega promotorja pred genom, ki kontrolira biosintezo antocianina (*ANTI* gen) s TALEN metodo vodila do povečane akumulacije antocianina v plodovih paradižnika, ki so se obarvali vijolično.

Drugo zanimivo področje biotehnologije, kjer CRISPR/Cas9 igra ključno vlogo, je pridobitev rastlin, ki so sposobne sinteze humanih proteinov, kot sta inzulin (za zdravljenje sladkorne bolezni) in albumin (za zdravljenje hemoragičnega šoka, opeklin in ciroze). Albumin se trenutno pridobiva iz humane plazme, katere količina je zelo omejena. Globalne zahteve po albuminu pa zelo naraščajo (trenutna poraba je približno 500 ton/leto). V ta namen so gen za humani albumin že vnesli v riž. Sintetizirani proteini se lahko izolirajo iz tkiv in po čiščenju uporabijo v zdravstvene namene (Kamburova in sod., 2017).

Največ aplikacij ODM v rastlinah je bilo opravljenih na acetolaktat sintaznih (*ALS*) genih, poznani tudi kot geni *AHAS*. Ta encim katalizira prvi korak v biosintezi esencialnih aminokislin izolevcina, levcina in valina. Mutirani encimi so selektivni s herbicidi (imidazolini, sulfonilureo, klorsulforoni in pirimidiniltiobenzoati), ki jih inhibirajo. Za doseglo odpornosti na prej omenjene herbicide, so ciljali na 3 mesta aminokislin, predvsem P197, W574 in S653. Prva objavljena uspešna študija je bila opravljena na celični liniji tobaka Nt-1 z uporabo himeroplastov, kasneje pa na koruzi, nato repnjakovcu ter oljni ogrščici. Veliko izboljšav (optimizacija dolžine oligonukleotida in zaščite 3' in 5' koncev) je bilo narejenih pri

pretvorbi modrega fluorescentnega proteina v zelenega s tarčnim vnosom le enega nukleotida v repnjakovec. Testirali so protoplaste iz transgene linije repnjakovca BFP, ki so jih tarčno spremenili z različnimi koncentracijami oligonukleotidov, od katerih je vsak vseboval C→T popravek. Največja koncentracija oligonukleotidov je dala največ mutantov (skoraj 5x več) (Sauer in sod., 2015).

6 REGULATIVA RASTLIN NASTALIH Z NOVEJŠIMI TEHNIKAMI GENSKEGA INŽENIRINGA

V ZDA je USDA (angl. *United States Department of Agriculture*) objavila mnenje, da so nekatere NHEJ-inducirane mutacije nastale z velikimi nukleazami, ZFN, TALEN in CRISPR/Cas9 izvzete iz njihovih regulatornih okvirjev, saj se tarčne modifikacije lahko doseže brez vključitve tuje DNA v rastlinski genom oz. se integrirani transgen, ki izraža nukleazo lahko odstrani po mutagenizi, kar vodi do rastlin z želeno tarčno mutacijo. Take mutacije se ne razlikujejo od naravnih in inducirano nastalih s konvencionalnimi kemičnimi mutageni ter mutagenozo z X ali gama žarki. Od teh metod tudi nobena ni regulirana (Songstad in sod., 2017). Tradicionalni biotehnološki pridelki (s vstavljenim transgenom) zahtevajo ogromno podatkov za regulatorno odobritev in poljske poskuse. Priprava takih podatkov je zahtevna, draga in časovno zamudna (približno 35 milijonov \$ na transgeni dogodek in 5,5 let za razvoj) (Lusser in Davies, 2013). V primeru rastlin s tarčnimi mutacijami, ki so bile regulatorno odobrene, se le-te lahko direktno testirajo na poljih, kar prinaša finančne koristi kmetijskim biotehnološkim podjetjem in omogoča raziskovalcem razvoj novih genetskih kombinacij (Songstad in sod., 2017).

»Knock-in« mutacije, ki vsebujejo tujo DNA bodo najverjetneje uvrščene kot ostali transgeni in zato zahtevajo podoben regulativni sistem, ki zahteva veliko pridobljenih podatkov, čeprav bi zaradi njihove večje natančnosti morda potrebovali manj zbranih podatkov za sprejemanje regulativnih odločitev. Čeprav so izzivi za uvedbo tarčnih »knock-in« mutacij pomembni, je njihov potencial v kmetijstvu velik, zato je pričakovati stalne napredke na tem področju (Songstad in sod., 2017).

V Evropi je Evropska komisija leta 2007 sestavila delovno skupino za ocenitev in opredelitev novih metod žlahtnjenja rastlin (vključno z ODM) in določila, kako je vsaka od teh tehnik povezana z regulacijo gensko spremenjenih organizmov (GSO). Skupina je zaključila, da je ODM tehnika mutagenoze in bi morala biti izključena iz regulacije GSO v EU (Songstad in sod., 2017).

7 ZAKLJUČEK

Transformacija z *Agrobacterium tumefaciens* je postala orodje za prenos želenih genov in posledično spremembo fenotipa za namene izboljšati pridelke v kmetijstvu za zadovoljevanje vedno večjih potreb svetovne populacije. Po svetu je bilo vložena ogromno truda za razvoj učinkovite posredne metode transformacije, zato je danes tudi ena izmed najpogosteje uporabljenih transformacijskih metod. Je prednostna metoda za pridobivanje komercialnih biotehnoloških produktov zaradi njene enostavnosti in pridobivanja čistejših učinkovin. Vendar pa še vedno obstaja veliko izzivov pri njeni uporabi, kot so transformacija ekonomsko pomembnih rastlinskih vrst, ki niso dovzetne za transformacijo z *A. tumefaciens*, uporaba za tarčno rekombinacijo v izogib naključni T-DNA integraciji, stabilna integracija transgena in stabilnost ter dedovanje v naslednjih generacijah brez izgube ali spremembe ekspresije in vnos multiplih pirimidiranih transgenov. Transformacijo z *A. tumefaciens* bi v prihodnje lahko izboljšali z natančno analizo rastlinskih proteinov, ki so vključeni v izboljššan prenos in vgradnjo T-DNA v gostiteljski genom, z razširitvijo obsega transformacij na razumevanje gostiteljskih patogenov in razvojem metod za minimiziranje nekroz v transformiranih tkivih (Ziemienowicz, 2013).

Spreminjanje rastlinskih genomov se je dogajalo že s procesi naravne mutageneze, uporaba specifičnih kemijskih in fizikalnih mutagenov pa je omogočila odkritje več kot 3.000 genetskih sprememb, ki imajo pozitiven prispevek na pridelek in v prehrani ljudi. Razvoj bioloških orodij, kot so ZFN, TALEN, CRISPR/Cas in ODM je veliko prispevalo k razumevanju in razvoju mutageneze, saj raziskovalcem zaradi natančnosti in usmerjenega delovanja omogočajo »knock-in« in »knock-out« dogodke genov ter nastanek SNP z ODM. Ta orodja so se začela hitro vključevati v biološke raziskave in raziskave v kmetijstvu, predvsem z namenom prehraniti rastočo globalno populacijo (Songstad in sod., 2017). Zaradi prednosti, kot so enostavna uporaba, učinkovitost, visoka specifičnost, minimalni netarčni dogodki in sposobnost multipleksiranja s CRISPR/Cas9 so zelo obetavni za uporabo v žlahtnjenju (Kamburova in sod., 2017). Zato jih nekateri že uvrščajo med nove tehnike žlahtnjenja rastlin (NPBT, angl. *new plant breeding techniques*). O NPBT trenutno razpravljajo regulatorni in nadzorni organi v Evropi in se poskušajo uskladiti, kako obravnavati klasične transgene tehnologije in tehnologije tarčnega spreminjanja genomov ter kako regulirati tako nastale produkte.

8 VIRI

- Barrangou R., Gasiunas G., Horvath P., Siksnys V. 2012. Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 39: 2579–2586
- Belhaj K., Chaparro-Garcia A., Kamoun S., Nekrasov V. 2013. Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant Methods*, 39, 9, doi:10.1186/1746-4811-9-39: 10 str.
- Bevan M. 1984. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acid Research*, 12: 8711-8721
- Boch J., Bonas U. 2010. *Xanthomonas* AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annual Reviews of Phytopathology*, 48: 419–436
- Bohanec B. 2004. Osnove rastlinske biotehnologije. V: Gensko spremenjena hrana. Javornik B., Strel B., Bohanec B. (ur.) Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 1-28
- Clasen B. M., Stoddard T. J., Luo S., Demorest Z. L., Li J., Cedrone F., Tibebe R., Davison S., Ray E. E., Daulhac A. 2015. Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout. *Plant Biotechnology*, 14, 1: 169-176
- Cunningham F. J., Goh N. S., Demirer G. S., Matos J. L., Landry M. P. 2018. Nanoparticle-mediated delivery towards advancing plant genetic engineering. *Trends in Biotechnology*, 36, 9: 882-897
- De la Riva G. A., Gonzalez-Cabrera J., Vazquez-Padron J., Ayra-Pardo C. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. *Molecular Biology and Genetics*, 1, 3: 1-16
- 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
- Gelvin S. B. 2003. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the »gene-jockeying« tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67, 1: 16-37
- Harrison M. M., Jenkins B. V., O'Connor-Giles K. M., Wildonger J. 2014. A CRISPR view of development. *Genes&Development*, 28: 1859-1872
- Haun W., Coffman A., Clasen B. M., Demorest Z. L., Lowy A., Ray E. in sod. 2014. Improved soybean oilquality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase2 gene family. *Plant Biotechnology Journal*, 12, 7: 934-940
- Hooykaas P. J. J., Schilperoort R. A. 1992. *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Molecular Biology*, 1, 19: 15-38
- Iuchi S. 1993. Phosphorylation/dephosphorylation of the receiver module at the conserved aspartate residue controls transphosphorylation activity of histidine kinase in sensor protein ArcB of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 286: 23972-23980
- Jankele R., Svoboda P. 2014. TAL effectors: Tools for DNA targeting. *Briefings in Functional Genomics*, 13, 5: 409-419

- Javornik B. 2004. Tržna pridelava gensko spremenjenih rastlin. V: Gensko spremenjena hrana. Javornik B., Strel B., Bohanec B. (ur.) Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 29-58
- Kamburova V. S., Nikitina E. V., Shermatov S. E., Buriev Z. T., Kumpatla S. P., Emani C., Abdurakhmonov I. Y. 2017. Genome editing in Plants: An Overview of Tools and Applications. *International Journal of Agronomy*, 15: 1-15
- Kim Y. G., Cha J., Chandrasegaran S. 1996. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 3: 1156-1160
- Lamb B. M., Mercer A. C., Barbas III C. F. 2013. Directed evolution of the TALE N-terminal domain for recognition of all 50 bases. *Nucleic Acids Research*, 41, 21: 9779-9785
- Lusser M., Davies, H. V. 2013. Comparative regulatory approaches for groups of new plant breeding techniques. *New Biotechnology*, 30: 437-446
- Luthar Z. 2017. Biotehnologija rastlin. BSc študij biotehnologije, 3. letnik: gradivo za laboratorijske in seminarske vaje: sklop Rastlinske transformacije. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 28 str.
- Malzahn A., Lowder L., Qi Y. Plant genome editing with TALEN and CRISPR. 2017. *Cell and Bioscience*, 7, 21, doi:10.1186/s13578-017-0148-4: 18 str.
- Nemudryi A. A., Valetdinova K. R., Medvedev S. P., Zakian S. M. 2014. TALEN and CRISPR/Cas genome editing systems: tools of discovery. *Acta Naturae*, 6, 22: 19-40
- Nixon B. T., Ronson C. W., Ausubel F. M. 1986. Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntxB* and *ntxC*. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 83: 7850-7854
- Osakabe Y., Osakabe K. 2014. Genome editing with engineered nucleases in plants. *Plant and Cell Physiology*, 56, 3: 389-400
- Pavletich N. P., Pabo C. O. 1991. Zinc-finger recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science*, 252, 5007: 809-817
- Sanagala R., Moola A. K., Diana R. K. 2017. A review on advanced methods in plant gene targeting. *Journal of Genetic engineering and Biotechnology*, 15, 2: 317-321
- Sauer N. J., Mozoruk J., Miller R. B., Warburg Z. J., Walker K. A., Beetham P. R., Schoepke C. R., Gocal G. F. W. 2015. Oligonucleotide-directed mutagenesis for precision gene editing. *Plant Biotechnology Journal*, 14: 496-502
- Shah T., Andleeb T., Lateef S., Noor M. A. 2018. Genome editing in plants: Advancing crop transformation and overview of tools. *Plant Physiology and Biochemistry*, v tisku: 1-30
- Shukla V. K., Doyon Y., Miller J. C., DeKolver R. C., Moehle E. A., Worden S. E., Mitchell J. C., Arnold N. L., Gopalan S., Meng X., Choi V. M., Rock J. M., Wu Y. Y., Katibah G. E., Zhifang G., McCaskill D., Simpson M. A., Blakeslee B., Greenwalt S. A., Butler H. J., Hinkley S. J., Zhang L., Rebar E. J., Gregory P. D., Urnov F. D. 2009. Precise genome modification in the crop *Zea mays* using zinc finger nucleases. *Nature*, 459: 437-441

- Songstad D. D., Petolino J. F., Voytas D. F., Reichert N. A. 2017. Genome editing of plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 36, 1: 1-23
- Sonoda E., Hohegger H., Saberi A., Taniguchi Y., Takeda S. 2006. Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. *DNA Repair* 5: 1021–1029
- Zambryski P., Joos H., Genetello C., Leemans J., Van Montagu M., Schell J. 1983. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *The EMBO Journal*, 2, 12: 2143-2150
- Ziemienowicz A. 2013. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: Factors, applications and recent advances. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3, 4: 95-102
- Zupan J. R., Zambryski P. C. 1995. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiology*, 107: 1041-1047

ZAHVALA

Na tem mestu bi se rada posebej zahvalila vsem, ki so me spremljali, spodbujali in stali ob strani med pisanjem diplomskega dela.

Posebna zahvala gre mentorici, prof. dr. Zlati Luthar za vse strokovne nasvete, potrpežljivost ter zanimive ure rastlinske biotehnologije, ki so me privedli do izbire te teme diplomskega dela.

Največja zahvala gre moji družini in sorodnikom, prijateljem ter fantu za vse spodbudne besede in pomoč.